

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/31, C07K 14/35, G01N 33/53, C12N 15/62, C07K 16/12, A61K 39/04		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/23885
			(43) Date de publication internationale: 8 août 1996 (08.08.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00166</p> <p>(22) Date de dépôt international: 31 janvier 1996 (31.01.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 08/382,184 1er février 1995 (01.02.95) US</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LAQUEYRERIE, Anne [FR/FR]; 83, avenue de Breteuil, F-75015 Paris (FR). MARCHAL, Gilles [FR/FR]; 4, rue Francisco-Ferrer, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). PESCHER, Pascale [FR/FR]; 124, rue Damrémont, F-75018 Paris (FR). ROMAIN, Félix [FR/FR]; 49bis, rue C.F.-Dreyfus, Bel-Air, F-91640 Fontenay-les-Briis (FR).</p> <p>(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harle & Phelip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: MYCOBACTERIAL PROTEINS, MICROORGANISMS PRODUCING SAME AND USES OF SAID PROTEINS IN VACCINES AND FOR DETECTING TUBERCULOSIS</p> <p>(54) Titre: PROTEINES DE MYCOBACTERIES, MICROORGANISMES LES PRODUISANT ET LEURS UTILISATIONS VACCINALES ET POUR LA DETECTION DE LA TUBERCULOSE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A <i>Mycobacterium tuberculosis</i> protein with a molecular weight of 28,779 Da, and hybrid proteins containing at least some portions of the sequence thereof. Said proteins are particularly useful in vaccines or for detecting tuberculosis-specific antibodies.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Protéines de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> présentant un poids moléculaire de 28.779 Da, et protéines hybrides contenant au moins des parties de sa séquence. Ces protéines peuvent en particulier être utilisées dans des vaccins ou pour la détection d'anticorps spécifiques de la tuberculose.</p>			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Protéines de mycobactéries, microorganismes les produisant et leurs utilisations vaccinales et pour la détection de la tuberculose

La présente invention a pour objet des protéines de mycobactéries et des microorganismes les produisant.

Elle est en outre relative à l'utilisation de ces protéines et microorganismes à des fins vaccinales ou pour la détection de la tuberculose.

La tuberculose continue d'être un problème de santé publique dans le monde. Le nombre des décès annuels directement en rapport avec la tuberculose est d'environ 3 millions et le nombre des nouveaux cas de tuberculose est d'environ 15 millions. Cette mortalité due à la tuberculose est encore élevée pour les pays développés; par exemple pour la France, il est de l'ordre de 1500 par an, chiffre certainement sous-évalué d'un facteur 2 ou 3 si l'on considère les évaluations de Roujeau sur les discordances entre les chiffres officiels et les résultats d'autopsies systématiques. La récente augmentation des cas de tuberculose, ou du moins l'arrêt de la décroissance de la fréquence de cette maladie, en corrélation avec le développement de l'épidémie de VIH/SIDA, est à prendre en compte. Au total, la tuberculose reste la première maladie infectieuse par sa fréquence pour la France et les pays développés, mais surtout pour les pays en voie de développement pour lesquels elle constitue la source principale de pertes humaines en rapport avec une seule maladie.

Actuellement, le diagnostic de certitude apporté par la mise en évidence de bacilles cultivables dans un prélèvement provenant du malade n'est obtenu que pour moins de la moitié des cas de tuberculose. Même dans les cas de tuberculose

pulmonaire qui représente 80 à 90% des atteints de tuberculose et qui est la forme de la maladie pour laquelle la mise en évidence de bacilles est la plus facile, l'examen des expectorations n'est positif que dans moins de la moitié des cas.

Le développement des techniques les plus sensibles, telles que la PCR (Amplification en chaîne par polymérisation), se heurte toujours à la nécessité d'obtenir un prélèvement. Les femmes et les enfants ne crachant habituellement pas, les prélèvements pour les formes de l'enfance nécessitent souvent une intervention médicale relativement spécialisée (biopsie ganglionnaire ou prélèvement par ponction lombaire du liquide céphalo-rachidien par exemple).

Par ailleurs, des inhibitions de la réaction PCR elle-même existent, de sorte qu'un prélèvement peut être inexploitable par cette technique du fait de l'impossibilité de contrôler leurs origines.

Enfin, le diagnostic bactériologique classique, examen microscopique et culture, par sa limite de sensibilité (au mieux de l'ordre de 10^4 à 10^5 bacilles dans le prélèvement) suppose qu'il y ait déjà eu un développement relativement important des bacilles et donc de la maladie.

La mise en évidence d'anticorps spécifiques dirigés contre *Mycobacterium tuberculosis* pourrait donc apporter une aide pour le diagnostic des formes fréquentes de la maladie pour lesquelles la mise en évidence des bacilles eux-mêmes est difficile ou impossible.

Des générations successives de chercheurs ont tenté de mettre au point une technique de diagnostic sérologique de la tuberculose.

Pour une revue générale des études effectuées sur ce sujet, on se référera avantageusement à la

demande PCT WO-92/21758.

Les techniques rapportées dans l'art antérieur sont majoritairement basées sur l'isolement préliminaire de protéines par leurs caractères biochimiques. Ce n'est qu'après cet isolement que les auteurs testent la capacité de ces protéines à détecter les individus atteints par la tuberculose.

La demande PCT WO 92/21758 expose une méthode pour sélectionner sans ambiguïté des antigènes représentatifs de l'infection tuberculeuse à l'aide de sérums provenant de malades atteints de tuberculose ou de cobayes immunisés par des bacilles vivants. Cette méthode qui se démarque de la majorité des expérimentations décrites dans l'art antérieur, a permis l'isolement de protéines de M.bovis présentant des poids moléculaires compris entre 44,5 et 47,5 kD.

Les dix sept acides aminés de l'extrémité N-terminale d'une de ces protéines ont été déterminés et sont les suivants:

ALA-PRO-GLU-PRO-ALA-PRO-PRO-VAL-PRO-PRO-ALA-ALA-ALA-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
ALA-PRO-PRO-ALA
14 15 16 17

L'article de ROMAIN et al. (1993, Infection and immunity, 61, 742-750) reprend en substance les résultats décrits dans cette demande internationale. Il décrit plus particulièrement un test ELISA en compétition utilisant un sérum immun de lapin polyclonal obtenu par immunisation de lapins à l'encontre du complexe protéique 45-47 kD mentionné ci-dessus.

Parallèlement, une banque génomique de Mycobacterium tuberculosis a été construite par JACOBS et al. (1991, Methods Enzymol, 204, 537-557).

Cette banque contient un grand nombre de clones différents.

Une protéine d'une autre espèce de mycobactéries, *M. leprae* a d'autre part été identifiée et séquencée par WIELES et al. (1994, Infection and Immunity, 62,252-258). Cette protéine, appelée 43 L possède un poids moléculaire déduit de la séquence nucléotidique d'environ 25,5 kDa. Son extrémité N-terminale possède une homologie de 47% avec celle du complexe protéique de 45-47 kDa identifié chez *Mycobacterium bovis* BCG, et dont la séquence de 17 acides aminés est reproduite ci-dessus.

Il existe, comme il a été indiqué ci-dessus, un intérêt majeur en médecine humaine, tant d'un point de vue thérapeutique que diagnostique, à identifier avec précision les protéines produites par les Mycobactéries et en particulier par *M.tuberculosis*.

En effet, le problème posé et non résolu jusqu'à présent réside dans l'obtention de vaccins contre un grand nombre de maladies.

Un autre problème réside dans la détection des maladies induites par les mycobactéries, telles que la tuberculose.

Le demandeur s'est donc attaché à déterminer la séquence d'une protéine de *Mycobacterium tuberculosis*, qui est suspectée de jouer un rôle important dans la réponse immunitaire.

Le demandeur a mis en évidence que l'ensemble des protéines correspondant au complexe 45-47 kD décrit précédemment est codé par un seul et même gène, et que la masse moléculaire calculée est différente de la masse moléculaire évaluée sur gel de polyacrylamide, du fait de la richesse en proline.

La présente invention a donc pour objet une protéine présentant au moins une partie d'une des

séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3 suivantes:

SEQ ID N° 2:

	Met	His	Gln	Val	Asp	Pro	Asn	Leu	Thr	Arg	Arg	Lys	Gly
	Arg	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Met	Ala	Ser	Ala
5	Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Val	Pro	Ala	Thr	Ala	Asn	Ala
	Asp	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala
	Ser	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala
	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Asn	Thr
	Pro	Asn	Ala	Gln	Pro	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Pro
10	Pro	Ala	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Ala
	Pro	Asn	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Arg	Ile	Asp	Asn	Pro	Val
	Gly	Gly	Phe	Ser	Phe	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	Trp	Val	Glu
	Ser	Asp	Ala	Ala	His	Phe	Asp	Tyr	Gly	Ser	Ala	Leu	Leu
	Ser	Lys	Thr	Thr	Gly	Asp	Pro	Pro	Phe	Pro	Gly	Gln	Pro
15	Pro	Pro	Val	Ala	Asn	Asp	Thr	Arg	Ile	Val	Leu	Gly	Arg
	Leu	Asp	Gln	Lys	Leu	Tyr	Ala	Ser	Ala	Glu	Ala	Thr	Asp
	Ser	Lys	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gly	Ser	Asp	Met	Gly	Glu
	Phe	Tyr	Met	Pro	Tyr	Pro	Gly	Thr	Arg	Ile	Asn	Gln	Glu
	Thr	Val	Ser	Leu	Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	Ala
20	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Val	Lys	Phe	Ser	Asp	Pro	Ser	Lys	Pro
	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Thr	Gly	Val	Ile	Gly	Ser	Pro	Ala
	Ala	Asn	Ala	Pro	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Gln	Arg	Trp	Phe
	Val	Val	Trp	Leu	Gly	Thr	Ala	Asn	Asn	Pro	Val	Asp	Lys
	Gly	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Arg	Pro	Leu
25	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Glu
	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Gly	Glu	Val	Ala	Pro
	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Gln	Arg	Thr	Leu	Pro	Ala

30 SEQ ID N° 3 :

	Asp	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala
	Ser	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala
	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Asn	Thr
35	Pro	Asn	Ala	Gln	Pro	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Pro
	Pro	Ala	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Ala

Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val
 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu
 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro
 5 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp
 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala
 10 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys
 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu
 15 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro
 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

L'invention est en outre relative à des
 protéines hybrides présentant au moins une partie
 20 d'une des séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3 et une
 séquence d'un peptide ou d'une protéine susceptible
 d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou chez
 l'animal.

Avantageusement, le déterminant antigénique est
 25 tel qu'il est susceptible d'induire une réponse
 humorale et/ou cellulaire.

Un tel déterminant peut être de diverses
 natures et notamment être un fragment d'antigène
 protéique, avantageusement glycoprotéique, utilisé en
 30 vue d'obtenir des compositions immunogènes
 susceptibles d'induire la synthèse d'anticorps dirigée
 contre des épitopes multiples.

Ces molécules hybrides peuvent être constituées
 en partie d'une molécule porteuse de séquences SEQ ID
 35 N° 2 ou SEQ ID N° 3 associée à une partie, en

particulier un épitope de la toxine diphtérique, la toxine tétanique, l'antigène HBS du virus HBV, l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite ou toute autre toxine ou antigène viral.

5 Les procédés de synthèse de molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des ADN hybrides codant pour les séquences protéiques ou peptidiques recherchées.

10 La présente invention comprend aussi des protéines présentant des différences secondaires ou des variations limitées dans leurs séquences en acides aminés ne les modifiant pas fonctionnellement par rapport aux protéines présentant les séquences SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3, ou aux protéines hybrides
15 comprenant au moins en partie ces séquences.

On notera que la présente invention a révélé une très forte différence de poids moléculaire entre le poids calculé de la protéine répondant à la séquence SEQ ID N° 3 qui est de 28779 Da et celui du
20 complexe, évalué par gel SDS, qui est de l'ordre de 45-47 kD. Cette différence est vraisemblablement due à la haute fréquence (21,7%) de la proline dans la chaîne polypeptidique.

D'autres objets de l'invention sont les
25 oligonucléotides, ARN ou ADN, codant pour les protéines précédemment définies. Un tel oligonucléotide présente avantageusement au moins une partie de la séquence SEQ ID N° 1 suivante :

GT GCTCGGGCCC AACGGTGC GG GCAAGTCCAC CGCCCTGCAT
30 GTTATCGCGG GGCTGCTTCG CCCCCGACGC GGGCTTGGTA CGTTTGGGGG
ACCGGGTGTT GACCGACACC GAGGCCGGGG TGAATGTGGC GACCCACGAC
CGTCGAGTCG GGCTGCTGTT GCAAGACCCG TTGTTGTTTC CACACCTGAG
CGTGGCCAAA AACGTGGCCT TCGGACCACA ATGCCGTCGC GGGATGTTTG
GGTCCGGGCG CGCGCTAGGA CAAGGGCGTC GGC ACTGCGA TGGCTGCGCG
35 AGGTGAACGC CGAGCAGTTC GCCGACCGTA AGCCTCGTCA GCTATCCGGG

GGCCAAGCCC AGCGCGTCGC CATCGCGCGA GCGTTGGCGG CCGAACCGGA
TGTGTTGCTG CTCGACGAGC CGCTGACCGG ACTCGATGTG GCCGCGGCCG
CGGGTATCCG TTCGGTGTG CGTAGTGTCG TCGCGAGGAG CGGTTGCGCG
GTAGTCCTGA CGACCCATGA CCTGCTGGAC GTGTTACGCG TGGCCGACCG
5 GGTATTGGTG CTCGAGTCCG GCACGATCGC CGAGATCGGC CCGGTTGCCG
ATGTGCTTAC CGCACCTCGC AGTCGTTTCG GAGCCCGTAT CGCCGGAGTC
AACCTGGTCA ATGGGACCAT TGGTCCGGAC GGCTCGCTGC GCACCCAGTC
CGGCGCCAC TGGTACGGCA CCCC GGTCCTTA GGATTTCGCT ACTGGGCATG
AGGCAATCGC GGTGTTCCCG CCGACGGCGG TGGCGGTGTA TCCGGAACCG
10 CCGCACGGAA GCCGCGCAA TATCGTCGGG CTGACGGTGG CGGAGGTGGA
TACCCGCGGA CCCACGGTCC TGGTGCGCGG GCATGATCAG CCTGGTGGCG
CGCCTGGCCT TGCCGCATGC ATCACCCTCG ATGCCGCCAC CGAACTGCGT
GTGGCGCCCG GATCGCGCGT GTGGTTCAGC GTCAAGGCGC AGGAAGTGGC
CCTGCACCCG GCACCCACC AACACGCCAG TTCATGAGCC GACCCGCGCC
15 GTCCTTGCGT CGCGCCGTTA ACACGGTAGG TTCTTCGCCA TGCATCAGGT
GGACCCCAAC TTGACACGTC GCAAGGGACG ATTGGCGGCA CTGGCTATCG
CGGCGATGGC CAGCGCCAGC CTGGTGACCG TTGCGGTGCC CGCGACCGCC
AACGCCGATC CGGAGCCAGC GCCCCCGGTA CCCACAACGG CCGCCTCGCC
GCCGTCGACC GCTGCAGCGC CACCCGCACC GGCGACACCT GTTGCCCCCC
20 CACCACCGGC CGCCGCCAAC ACGCCGAATG CCCAGCCGGG CGATCCCAAC
GCAGCACCTC CGCCGGCCGA CCCGAACGCA CCGCCGCCAC CTGTCAATTGC
CCCAAACGCA CCCC AACCTG TCCGGATCGA CAACCCGGTT GGAGGATTCA
GCTTCGCGCT GCCTGCTGGC TGGGTGGAGT CTGACGCCGC CCACTTCGAC
TACGGTTCAG CACTCCTCAG CAAAACCACC GGGGACCCGC CATTTCCCGG
25 ACAGCCGCCG CCGGTGGCCA ATGACACCCG TATCGTGCTC GGCCGGCTAG
ACCAAAAGCT TTACGCCAGC GCCGAAGCCA CCGACTCCAA GGCCGCGGCC
CGGTTGGGCT CGGACATGGG TGAGTTCTAT ATGCCCTACC CGGGCACCCG
GATCAACCAG GAAACCGTCT CGCTCGACGC CAACGGGGTG TCTGGAAGCG
CGTCGTATTA CGAAGTCAAG TTCAGCGATC CGAGTAAGCC GAACGGCCAG
30 ATCTGGACGG GCGTAATCGG CTCGCCCCGCG GCGAACGCAC CGGACGCCGG
GCCCCCTCAG CGCTGGTTTG TGGTATGGCT CGGGACCGCC AACAACCCGG
TGGACAAGGG CGCGGCCAAG GCGCTGGCCG AATCGATCCG GCCTTTGGTC
GCCCCGCCGC CGGCGCCGGC ACCGGCTCCT GCAGAGCCCG CTCCGGCGCC
GGCGCCGGCC GGGGAAGTCG CTCCTACCCC GACGACACCG ACACCGCAGC
35 GGACCTTACC GGCCTGACC

La présente invention est en outre relative à un microorganisme produisant l'une des protéines telles que décrites ci-dessus et plus particulièrement un microorganisme sécrétant une telle protéine.

5 Préférentiellement, un tel microorganisme est une bactérie telle que Mycobacterium bovis BCG. Ces bactéries sont déjà utilisées chez l'homme afin d'obtenir une immunité contre la tuberculose.

10 La fabrication de protéines hybrides selon la présente invention dans M. bovis BCG présente des avantages particuliers. En effet, M. bovis BCG est une souche largement utilisée à des fins vaccinales et dont l'innocuité pour l'homme est reconnue. Après
15 injection dans l'organisme humain, elle se développe lentement durant 15 jours à 1 mois, ce qui permet une excellente présentation de l'antigène contre lequel on veut obtenir une réponse à l'organisme.

20 On connaît par contre très mal Mycobacterium leprae, qui est l'agent de la lèpre chez l'homme. En effet, cette bactérie n'a pu être jusqu'à présent cultivée sur un milieu de culture et possède un temps de croissance très long par rapport à M.bovis.

25 Sa pathogénicité potentielle est de plus un argument évident pour ne pas l'utiliser à des fins vaccinales.

30 Les protéines ayant les séquences SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N°3 présentent l'avantage d'être reconnues par des anticorps présents chez les patients tuberculeux et constituent donc a priori des antigènes fortement immunogènes.

 Les protéines sont issues de M. tuberculosis, qui est une espèce très proche de M.bovis, ces deux bactéries étant responsables de la tuberculose respectivement chez l'homme et chez les bovidés.

35 Les protéines issues de M.tuberculosis sont

donc susceptibles de s'exprimer chez M.bovis et, pour celles possédant un peptide signal, d'être excrétées dans le milieu de culture.

5 M.bovis présentant les avantages indiqués ci-dessus pour la vaccination de l'homme et d'autre part les protéines répondant aux séquences SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3 induisant une forte réponse immunitaire chez l'homme, il est particulièrement avantageux de produire dans M.bovis des protéines hybrides
10 comportant une partie de la protéine issue de M.tuberculosis.

En effet, il est notoire que des antigènes de microbes pathogènes contre lesquels une vaccination est recherchée, peuvent n'induire qu'une très faible
15 réponse chez l'homme s'ils ne sont pas présentés d'une manière spécifique.

La présente invention résoud ce problème de deux manières:

- d'une part en présentant la protéine hybride
20 à la surface de M.bovis BCG, et/ou excrétée par la bactérie, et

- d'autre part en associant un déterminant antigénique connu pour induire une forte réponse immunitaire, c'est-à-dire le déterminant antigénique
25 de l'une des protéines de SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3, à un déterminant antigénique induisant une faible réponse s'il est injecté seul.

L'association du déterminant antigénique d'une des protéines SEQ ID N° 2 ou SEQ ID N° 3 permet
30 d'amplifier la réponse immunitaire à l'encontre du second déterminant antigénique de la protéine hybride. Ce phénomène peut être rapproché de l'effet carrier haptène.

Il est clair qu'une telle opération n'est pas
35 envisageable avec une protéine issue de M.leprae,

telle que celle décrite dans l'article de Wieles et al. (1994, précédemment cité) car d'une part, du fait de la plus grande distance entre *M. tuberculosis* et *M. leprae*, une telle protéine risque de ne pas être convenablement exprimée et d'autre part, on connaît moins bien la réponse immunitaire induite par cette protéine de *M. leprae*. En outre, l'introduction d'une protéine d'une espèce pathogène à des fins vaccinales constitue un risque potentiel pour la santé humaine que les industries pharmaceutiques sont réticentes à prendre.

L'ensemble de ces arguments concoure donc à distinguer les protéines de séquences SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3 de la protéine de *M. leprae* décrites par Wieles et al. (1994, précédemment cité) malgré leurs homologues apparentes de séquences (voir plus loin la figure 17).

La présente invention est encore relative à des vaccins ou médicaments contenant au moins une protéine, ou un microorganisme tels que précédemment définis.

Des vaccins contenant les protéines non greffées peuvent être utilisés pour immuniser des individus à l'encontre de la tuberculose. Les protéines greffées portant un épitope provenant d'un agent biologique autre que *M. bovis* peuvent être utilisées pour l'immunisation contre d'autres maladies.

A titre indicatif, on pourra utiliser de 1 à 500 µg de protéine par dose pour un individu, ou de 10^3 à 10^7 bactéries recombinantes par individu par voie intradermique.

La présente invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique contenant au moins une quantité pharmaceutiquement efficace d'une protéine ou

d'un microorganisme tels que précédemment définis en association avec des diluants ou des adjuvants pharmaceutiquement compatibles.

5 La présente invention a aussi pour objet un procédé de détection d'anticorps spécifiques de la tuberculose dans lequel un fluide biologique, dans lequel on recherche la présence desdits anticorps, est mis en contact avec une protéine telle que décrite ci-dessus.

10 Avantageusement, ladite protéine est fixée sur un support.

Une telle détection peut notamment être mise en oeuvre par la méthode du Western Blot (immuno-
15 empreinte), par une méthode immunoenzymologique (ELISA) ou par une méthode radioimmunologique (RIA), à l'aide d'une trousse de dosage, contenant ces protéines ainsi que, notamment, des solutions tamponnées permettant d'effectuer la réaction immunologique et si nécessaire des substances
20 permettant de révéler le complexe anticorps-antigène formé.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples suivants et les dessins annexés dans lesquels:

25 La figure 1 représente le profil de densité optique (DO) à 240 nm de la filtration moléculaire (Si 300) d'une fraction de M.tuberculosis non retenue sur une colonne échangeuse d'ions dans les conditions décrites plus loin.

30 La figure 2 représente le profil en densité optique à 220 nanomètres de la séparation sur colonne échangeuse d'ions (DEAE) à haute pression des molécules provenant de la fraction 1 obtenue lors de la filtration moléculaire précédente.

35 La figure 3 est le profil de densité optique à

220 nanomètres de la chromatographie sur colonne en phase inverse de la fraction 1 issue de la chromatographie échangeuse d'ions précédente.

5 Les figures 4A à 4E, sont des photographies des membranes de PVDF mises en présence respectivement:

- d'un colorant de molécules (4A) transférées sur la membrane de PVDF. Coloration Aurodye (Amersham);
- 10 - d'un mélange de sérums de cobayes immunisés avec des bacilles vivants (4B) ou morts (4C);
- d'un sérum de lapin (4D) immunisé avec des antigènes purifiés à partir du BCG (Infection and Immunity (1993) 61 742-750).
- 15 - d'un anticorps monoclonal référencé I-1081 (4E).

Ces membranes de PVDF avaient reçues préalablement les molécules des fractions séparées sur la colonne échangeuse d'ions basse pression séparées par électrophorèse en gel acrylamide. La piste 0 correspond au matériel brut de départ, la piste 1 à la fraction non retenue, et la piste 2 à la fraction retenue.

25 Les figures 5A à 5E représentent des membranes de PVDF correspondant à un gel obtenu par migration des 5 fractions (1 à 5) obtenues sur la colonne de gel filtration Si300 et de la fraction non retenue sur la colonne DEAE basse pression (0). Après transfert de gels identiques sur des membranes de PVDF l'une est révélée avec un colorant des protéines (Aurodye, Amersham (5A), ou avec un sérum de cobayes immunisés avec des bacilles vivants (5B), ou morts (5C), un sérum de lapin (5D) ou l'anticorps monoclonal(5E).

35 Les figures 6A à 6E représentent des membranes de PVDF correspondant à un gel obtenu par migration des fractions obtenues sur colonne échangeuse d'ions

haute pression (1 à 3) et de la fraction 1 obtenue par filtration sur tamis moléculaire (puits O), ladite membrane étant mise en présence:

- d'un colorant des protéines (6A),
- 5 - d'anticorps de sérums de cobayes immunisés respectivement avec des bacilles vivants (6B) ou morts (6C),
- d'un sérum de lapin (6D),
- de l'anticorps monoclonal (6E).

10 Les figures 7A à 7D représentent l'empreinte des gels sur des membranes correspondant à la migration de la fraction 1 obtenue sur colonne échangeuse d'ions (O) et des fractions obtenues par chromatographie en phase inverse (1 à 5), mises en
15 présence des mêmes réactifs que dans les figures 6A, à 6B, 6D et 6E avec les mêmes codes.

 La figure 8 illustre le criblage de la banque génomique d'expression de M.tuberculosis H37Rv dans M. smegmatis. Les surnageants de M. bovis BCG, M.
20 smegmatis non transformés et M. smegmatis transformés par des clones recombinants exprimant ou n'exprimant pas des protéines recombinantes reconnues par des anticorps ont été testés à différentes dilutions.

 La figure 9 illustre la migration en gel
25 d'agarose de trois cosmides sélectionnés dans la banque, électroporés dans E. coli et extraits par lyse alcaline.

 La figure 10 représente la migration sur un gel de l'ADN cosmétique de pLA1 extrait de E.coli NM554
30 digéré par BamHI (a), SmaI (b), HpaI (c), NotI (d), SspI (e), EcoRI (f) et Hind III (g).

 La figure 11 illustre l'expression des protéines de 45/47 kDa dans les mycobactéries. Les surnageants de culture bactérienne de 7 jours ont été
35 lavés et concentrés sur une membrane Amicon PM10,

lyophilisés et analysés en immuno-empreinte. Les protéines sont révélées par des anticorps polyclonaux d'un sérum de lapin dilué au 1/500è.

Sont déposés par puits:

5 (1) 0,25 µg de protéines de 45/47 kDa purifiées de M.bovis BCG,

(2) 5 µg de surnageant de M. smegmatis mc²155 transformé par pLA1,

10 (3) 5 µg de surnageant de M. smegmatis mc²155 non transformé,

(4) 5 µg de surnageant de M.bovis BCG.

La figure 12 illustre l'expression des protéines de 45/47 kDa dans les mycobactéries. Les surnageants de culture bactérienne ont été lavés et
15 concentrés sur une membrane Amicon PM10, puis lyophilisés et analysés dans un test Elisa en compétition. Différentes concentrations des surnageants lyophilisés sont mises en présence d'une dilution au 1/8000è du sérum polyclonal de lapin, puis
20 ce mélange est transféré dans des puits sur lesquels sont fixées les protéines purifiées.

Les figures 13A et 13B sont des profils plasmidiques (13A) et profils de restriction BamH I (13 B) de différents clones recombinants
25 pUC18::M.tuberculosis H37Rv, obtenus par ligation des fragments d'une digestion BamH I du cosmide pLA1 dans pUC18. Sur cette figure sont présentés 21 des 36 clones étudiés. Les puits "p" correspondent au vecteur témoin pUC18, les puits "m" correspondent aux
30 marqueurs de taille qui sont des fragments du plasmide pKN coupés par Pvu II.

La figure 14 est la carte de restriction des inserts permettant l'expression des protéines de 45/47 kDa dans E.coli. Un ensemble de clones a été obtenu
35 par des délétions à partir des plasmides pLA34 et

pLA4, contenant l'insert de 3 kb cloné dans les deux orientations. Les flèches indiquent la direction de la détermination des séquences à partir de ces clones à l'aide des amorces "directes" et "inverses".

5 B, BamH I S, Sma I E, EcoR I K Kpn I
H, Hind III Sa, Sal I Sp, Sph I

10 La figure 15 illustre l'expression des protéines de 45/47 kDa dans E.coli. Les lysats de culture bactérienne ont été analysés en immuno-
empreinte.

Les protéines sont révélées par des anticorps polyclonaux de lapin purifiés sur DEAE, puis absorbées sur un lysat de E. coli immobilisé sur colonne Sepharose-4B activé par du bromure de cyanogène.

15 Sont déposés par puits:

- (1) 0,2 µg de protéines purifiées de 45/47 kDa,
(2) 25 µg de lysat de E.coli XL-Blue transformé par pLA34-2,
(3) 25 µg de lysat de E.coli XL-Blue transformé par
20 pLA34,
(4) 25 µg de lysat de E.coli XL-Blue non transformé.

La figure 16 illustre l'expression des protéines de 45/47 kDa dans E.coli. Les lysats de culture bactérienne, analysés par un test Elisa en
25 compétition ont été utilisés sous forme brute.

La figure 17 est une comparaison de séquence SEQ ID N°2 selon l'invention et de la séquence de la protéine de M.leprae (mln 431).

30 La figure 18 est un profil d'hydrophobicité de la protéine de séquence SEQ ID N°2.

EXEMPLE 1:

Procédé de purification des antigènes de M.tuberculosis

1) Obtention des antigènes:

35 Des cultures de M.tuberculosis (souche H37Rv)

sont effectuées en ballons contenant 130 ml de milieu synthétique de Sauton selon une technique classique décrite pour la culture du BCG (Gheorghiu et al. Bull. Institut Pasteur 1983, 81: 281-288). Le milieu de culture est récolté après 20 jours à 37°C, décanté et filtré (0,22 µm) à la température du laboratoire. Ces opérations sont réalisées dans une boîte à gants pour des raisons de sécurité. Le milieu de culture récolté et filtré est de nouveau filtré sur filtre 0,22 µm sous hotte de sécurité avant d'être utilisé pour les opérations suivantes:

Placé sur une membrane Amicon (PM10) sous une pression d'azote de 2 bars et à 4°C, le milieu de culture est lavé intensivement avec de l'eau rétro-osmosée contenant 4% de butanol, puis concentré 10 à 20 fois par rapport au volume initial. Ce milieu de culture concentré, contenant les molécules non exclues par la membrane PM10 Amicon, est lyophilisé, pesé et conservé sous forme de poudre à -20°C. Les 12g du matériel de départ -utilisés pour le schéma de purification décrit ci-dessous sont obtenus à partir de 70 litres de milieu de culture.

Schéma de purification:

2) Colonne échangeuse d'ions à basse pression:

Une colonne échangeuse d'ions préparative à basse pression de hauteur 300 mm et de diamètre 32 mm est préparée avec environ 240 ml de gel Trisacyl M (SEPRACOR). Elle est équilibrée avec une solution saline tamponnée ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH = 7, et NaCl 10 mM) contenant 4% de butanol.

Le matériel concentré et lyophilisé préparé à l'étape antérieure est solubilisé (dans la solution saline tamponnée précédente) puis ultracentrifugé - durant 120 mn à 40.000 G. Seule la partie supérieure (4/5) de la solution centrifugée est reprise et

appliquée sous le contrôle de la pompe péristaltique sur la colonne échangeuse d'ions. Une première fraction majoritaire non retenue sur la colonne est recueillie. Une seconde fraction est obtenue après
5 élution de la colonne avec une solution saline tamponnée (Na_2HPO_4) NaH_2 et 10 mM, pH = 7,5 et NaCl 1M). Chaque fraction, placée sur une membrane Amicon (PM10) sous une pression de 2 bars et lavée intensivement avec de l'eau rétro-osmosée contenant 4%
10 de butanol, est concentrée environ 15 fois. La fraction non retenue par la colonne contient 2,9 g de matériel et l'essentiel des molécules qui sont purifiées dans les étapes suivantes. La fraction retenue par la colonne puis éluee par la solution
15 concentrée en sel contient environ 1,01 g de matériel.

3) Filtration sur gel

Une colonne préparative haute pression Si 300, 3 μm de 50 x 750 mm (SERVA), est équilibrée par passage d'une solution saline tamponnée (Na_2HPO_4 50 mM
20 ajustée à pH 7,5 avec KH_2PO_4) contenant 4% de butanol; cette solution est préalablement filtrée sur une membrane (0,22 μm). Le débit de la colonne est ajusté à 1,25 ml bar par mn; la pression maximum réglée à 45 bars n'est pas atteinte.

25 Le matériel à injecter sur la colonne est préparé à la concentration de 50 mg/ml dans la solution tampon/butanol. Des échantillons de 10 ml sont préparés et congelés à -20°C . Chaque échantillon de 10 ml, filtré de nouveau après décongélation et
30 injecté sur la colonne, contient environ 500 mg de matériel brut. Les profils des densités optiques à 240 nm sont rapportés figure 1 pour une séquence typique de séparation. Les cinq fractions principales choisies d'après le profil sont concentrées à 4°C et lavées
35 intensivement sur membrane Amicon PM10 avec de l'eau

5 rétro-osmosée contenant 4% de butanol. Chaque fraction concentrée est lyophilisée, pesée puis conservée à -20°C. La fraction 1 de cette étape contient les molécules principales reconnues par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants ou par les anticorps des malades tuberculeux. Seule cette fraction est soumise à l'étape suivante.

4) Colonne échangeuse d'ions:

10 Une colonne préparative DEAE-TSK 5PW de 21,5 x 150 mm (LKB) est équilibrée avec une solution saline tamponnée ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH = 7,5 et NaCl 10 mM) contenant 4% de butanol. La pression maximum est inférieure à 30 bars pour un débit de 6 ml/mn. Pour le tampon d'élution, seule la concentration de NaCl est
15 modifiée (1 M). Un gradient linéaire est appliqué selon le schéma indiqué figure 2 après injection d'un volume d'échantillon de 4 ml contenant au total 100 mg du matériel précédent. Les fractions principales sont recueillies selon le profil en densité optique à
20 240nm. Ces fractions sont concentrées et lavées sur membrane PM_{10} (Amicon) par de l'eau rétro-osmosée contenant 4% de butanol, puis lyophilisées. Une fois pesée, chaque fraction est conservée à -20°C. Seule la fraction 1 de cette étape contient la majorité des
25 molécules reconnues par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants; elle est soumise à l'étape suivante de séparation.

5) Colonne phase inverse:

30 Une colonne RP 300 C_8 10 μm de 4,6 x 250 mm (Aquapore Brownlee lab.) est équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{COO CH}_3$ 20 mM) filtré sur 0,22 μm avec un débit de 2 ml/mn sous une pression maximum de 115 bars. Le tampon d'élution contenant 90% d'acétonitrile est appliqué selon le profil indiqué
35 sur la figure 3 après injection d'un échantillon de 10

mg sous un volume de 1 ml. Le profil de densité optique à 220 nm permet de séparer cinq fractions principales qui sont concentrées par évaporation sous vide à 40°C, puis lyophilisées.

5 6) Immunodétection des antigènes:

Des gels dénaturants à 10% de polyacrylamide, 0,1 % de SDS sont préparés selon la technique classique de Laemmli, (Nature 1970, 277: 680-685). Des échantillons contenant entre 10 et 2 µg de matériel, en fonction de l'étape de la purification, sont appliqués dans un tampon contenant 5% de mercaptoéthanol, 3% de SDS et une trace de bleu de bromophénol sous un volume de 10 µl dans chaque piste du gel. Après électrophorèse jusqu'à la limite de migration du bleu, les molécules présentes dans les échantillons sont transférées sur une feuille de PVDF (Millipore) en appliquant un champ électrique modéré durant une nuit (Harlow et Lane, Antibodies, A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (eds) 1988).

Une coloration de la feuille de PVDF par une solution de bleu de Coomassie durant moins d'une minute, suivie d'une décoloration, permet le repérage des marqueurs de poids moléculaire dont les contours sont entourés d'un trait de crayon. Après décoloration totale, la feuille est lavée durant 30 mn à la température du laboratoire par du PBS + Triton X100 3%, puis trois fois 5 mn avec du PBS seul. La feuille est alors saturée avec du PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre durant 1 h à 37°C, puis lavée avec du PBS + Tween 20 (0,2 %) trois fois.

Une incubation est effectuée avec les immunsérums dilués au 1/20^{ème} dans le tampon PBS + Tween 20 (0,2 %) + lait en poudre 5% durant 1 h 30 à 37°C avec des agitations périodiques. Puis trois lavages en

PBS + Tween sont opérés avant l'incubation avec les anticorps anti-immunoglobulines marqués avec la phosphatase alcaline. Les anticorps anti-immunoglobulines humains et anti-immunoglobulines de cobayes, marqués à la phosphatase (Biosys) sont utilisés à la dilution finale de 1/2500 en PBS + Tween 20 (0,2 %) + lait (5%). Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, les feuilles de PVDF sont lavées trois fois en PBS + Tween, puis incubées à la température du laboratoire durant 5 à 10 mn, dans le tampon de révélation contenant BCIP et NBT (Harlow et Lane, précédemment cités). La réaction est arrêtée et après séchage des feuilles celles-ci sont photographiées.

7) Composition en acides aminés:

Une analyse de la composition globale en acides aminés est effectuée pour chaque fraction chromatographique dans l'unité de Chimie Organique de l'Institut Pasteur. Un analyseur Beckman LS 6300 est utilisé.

La composition globale exprimée en fréquence des acides aminés des protéines de 45-47 kD est la suivante:

ASN/ASP: 10,4%, THR: 5,7%; SER:5,6%; GLN/GLU: 6,3%; GLY:7,1%; ALA: 19,3%; VAL: 6,2%; ILE:2,2%; LEU: 4,4%; TYR: 2,2%; PHE: 2,4%; LYS : 2,7 %; ARG: 2,7%; PRO: 20,9%.

EXEMPLE 2:

Détermination de la spécificité immunologique des protéines et fractions protéiques de M.tuberculosis et isolement des antigènes reconnus par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants.

Des groupes de 12 à 15 cobayes (femelles Hartley de 250 à 300 g au début de l'expérience) ont reçu soit des mycobactéries vivantes (2×10^7 unités

viables de BCG en deux injections intradermiques dans 0,1 ml de solution saline), soit 2 mg de mycobactéries de la même souche tuées par la chaleur (120°C, 30 mn) en intramusculaire dans 0,5 ml d'une émulsion solution saline dans l'adjuvant de Freund incomplet (1/1). Les sérums de différents groupes de cobayes ont été prélevés 7 à 12 mois après l'immunisation, filtrés (0,22 µm) puis distribués en petits volumes qui sont congelés et conservés à -20°C. Des essais de plusieurs groupes d'immunsérums ont été effectués (5 après immunisation avec des bactéries vivantes et 6 après immunisation avec des bactéries tuées). Les résultats rapportés ont été obtenus avec un groupe de sérums représentatifs de chaque type d'immunisation; les différences entre groupes sont minimales pour le même schéma d'immunisation.

1) Etape de séparation sur la colonne échangeuse d'ions à basse pression.

Le milieu de culture (lavé et concentré sur membrane Amicon PM10 puis lyophilisé) est ultracentrifugé puis appliqué sur la colonne échangeuse d'ions à basse pression. Deux fractions l'une non retenue par la colonne et l'autre éluée par une solution tamponnée à haute molarité sont recueillies, lavées et concentrées sur membrane Amicon PM10 puis lyophilisées.

Chaque fraction (10µg) est placée sur une piste d'un gel SDS, puis, après la séquence d'électrophorèse, transfert sur membrane PVDF et immunodétection, les fractions contenant les molécules majoritaires réagissant avec les différents sérums sont repérées.

La figure 4 montre des immuno-empreintes de gels identiques révélées avec un colorant de protéines transférées (Aurodye-Amersham) (4A) ou des sérums de

cobayes immunisés avec des bacilles vivants (4B) ou morts (4C). Les immuno-empreintes 4D et 4F ont révélées respectivement un sérum de lapin dirigé contre des molécules identiques de BCG (Infection and Immunity, 1993 61 742-750) et le surnageant de l'hybridome I-1081 producteur d'un anticorps monoclonal, déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM). Seule la fraction non retenue par la colonne contient des molécules de 45/47 kDa reconnues par les sérums de cobayes immunisés avec des bacilles vivants ou reconnues par le surnageant de l'hybridome cité précédemment.

2) Etape de filtration moléculaire sur Si 300.

La fraction non retenue de l'étape précédente est injectée sous un volume d'échantillon de 10 ml contenant 500 mg de matériel sur la colonne Si 300. Les fractions 1 à 5 sont séparées selon le profil indiqué sur la figure 1, regroupées pour les injections successives, puis lavées, concentrées et lyophilisées.

Chaque fraction (10 µg) est placée sur une piste d'un gel SDS; puis, après la séquence d'électrophorèse, transfert sur membrane PVDF et immunodétection, les fractions contenant les protéines majoritaires réagissant avec les différents sérums sont repérées.

La figure 5 montre des immuno-empreintes de gels identiques révélées avec une coloration des protéines (Aurodyne-Amersham) ou avec des sérums de cobayes immunisés avec des bacilles vivants (5B) ou avec des bacilles morts (5C). Les immuno-empreintes 5D et 5E ont été révélées avec respectivement un sérum de lapin dirigé contre ces molécules purifiées à partir de BCG et avec l'anticorps monoclonal I-1081.

Deux antigènes de 45 et 47 kD présents dans la fraction 1 sont reconnus essentiellement par les anticorps des animaux immunisés avec des bacilles vivants ou avec le sérum polyclonal de lapin ou avec l'anticorps monoclonal. Cette fraction est sélectionnée pour la seconde étape de purification.

3) Etape sur colonne échangeuse d'ions

Un échantillon de 100 mg de la fraction précédente est chargé sur une colonne DEAE-TSK préparative et élué par un gradient de NaCl. Le profil à 220 nm des molécules éluées définit trois fractions principales (figure 2). Après regroupement, chaque fraction obtenue par les injections successives du matériel est lavée, concentrée et lyophilisée.

Après électrophorèse sur gel SDS de 5 µg de chacune des fractions précédentes, les immunempreintes sur feuille PVDF sont révélées par le colorant de protéines (Aurodyne) (Fig. 6A), par les sérums de cobayes immunisés avec des bacilles vivants (fig. 6B) ou morts (Fig. 6C), le sérum de lapin (Fig. 6D) ou l'anticorps monoclonal (Fig. 6E). La fraction 1-DEAE ne contient que quelques antigènes reconnus par les anticorps des animaux immunisés avec des bacilles morts. Par contre, cette même fraction 1-DEAE contient un doublet à 45/47 kD fortement reconnu par les anticorps des cobayes immunisés avec des bacilles vivants, ainsi que le sérum de lapin ou l'anticorps monoclonal. Cette fraction 1-DEAE est choisie pour l'étape suivante de purification.

4) Etape sur colonne phase-inverse

Une colonne RP 300 10 µm, équilibrée avec le tampon acétate d'ammonium (20 mM), reçoit un échantillon de 1 ml contenant 5 à 10 mg maximum de la fraction 1-DEAE précédente. L'élution avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 90% selon le schéma de la figure

3 permet de récupérer cinq fractions principales. Ces fractions sont concentrées par évaporation sous vide à 40°C pour éliminer la majorité de l'acétonitrile, puis lyophilisées.

5 La fraction 4 (gradient de 30 à 50% d'acétonitrile) contient la majorité des molécules reconnues par les anticorps des animaux immunisés avec des bacilles vivants, ou par les anticorps présents dans le sérum de lapin ou par l'anticorps monoclonal
10 et essentiellement ces molécules, d'après la coloration des protéines par Aurodyne (Fig.6).

EXEMPLE 3:

Clonage et expression de protéines de 45/47 kD de Mycobactérium tuberculosis dans Mycobacterium
15 smegmatis et Escherichia coli.

1) Matériels et méthodes.

1.1 Souches bactériennes et conditions de croissance, préparations de surnageants et d'extraits
20 bactériens.

M.bovis BCG (souche 1173P₂) a été cultivé en milieu synthétique de Sauton 7 jours à 37°C, puis le surnageant est filtré à travers une membrane de 0,22 µm. Ces surnageants sont conservés bruts en présence de butanol à 4% ou concentrés sur membrane Amicon-PM
25 10 et lyophilisés.

M. smegmatis mc² 155 (Snapper et al.1990, Molecular Microbiol., 4, 1911-1919) a été cultivé en milieu liquide 7H9 + OADC 7 jours à 37°C. Chaque clone de M.smegmatis mc² 155 transformé par les cosmides de la banque pYUB18: M.tuberculosis a été cultivé en présence de kanamycine à 25 mg/ml. Les cultures ont été ensuite centrifugées 15 mn à 5000 tpm, les surnageants de culture séparés et conservés à 4°C en présence de butanol à 4%. Ces préparations sont
30 utilisées lors de tests ELISA dans lesquels la
35

composition des milieux de culture n'interfère pas. Lorsque les surnageants de culture de clones sont analysés en gel SDS-PAGE, ceux-ci sont cultivés en milieu synthétique de Sauton 7 jours à 37°C, les surnageants de culture filtrés à travers une membrane de 0,22 µm puis concentrés sur membrane Amicon-PM10 et lyophilisés.

Les souches de E.coli NM554 et XL 1-Blue ont été cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) solide ou liquide à 37°C. Les clones de E.coli XL 1-Blue, transformés par le plasmide pUC18, ont été cultivés en présence d'ampicilline à 25 µg/ml.

Les lysats de culture bactérienne de E.coli XL1-Blue et de chaque clone transformé par les plasmides recombinants pUC18: M.tuberculosis ont été préparés par une série de congélations/décongélations rapides de -70°C à + 60°C de bactéries obtenues après une culture d'une nuit (16h). Les lysats sont centrifugés, les surnageants séparés et conservés à -20°C. Un dosage des protéines de ces préparations a été effectué par la technique BCA (Pierce).

1.2 Vecteurs de clonage

La banque génomique de M.tuberculosis utilisée (Jacobs et al. 1991 précédemment cités) a été fournie par électroporation dans M.smegmatis mc² 155 par Stewart Cole. Le demandeur a disposé de 400 clones recombinants.

La banque a été construite dans un cosmide, vecteur navette pYUB18. Celui-ci dérive du plasmide pYUB12 (Snapper et al. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 1988, 85: 6987-6991) dans lequel a été insérée la séquence Cos du bactériophage lambda permettant une amplification et une bonne conservation des cosmides recombinants de la banque sous forme de lysats de phages. Cette banque a été construite de la manière

suiivante: l'ADN génomique de *M.tuberculosis* souche H37Rv a été digéré partiellement par l'enzyme Sau 3a, dans des conditions permettant d'obtenir un maximum de fragments de 35 kb à 45 kb. Ces fragments ont été purifiés puis ligaturés dans pYUB18, digérés par l'endonucléase de restriction BamHI et déphosphorylés.

Le vecteur plasmidique pUC18 (Yanisch-Perron et al. Gene, 1985, 33: 103-119) a été utilisé pour le sous-clonage dans *E.coli* XL-Blue. Ce plasmide multicopie porte un fragment d'ADN dérivé de l'opéron lac de *E.coli* qui code pour un fragment amino-terminal de la bêta-galactosidase. Ce fragment inductible par l'isopropyl bêta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) est capable d'établir l'alpha-complémentation avec la forme de la bêta-galactosidase défective codée par la souche hôte *E.coli* XL1-Blue. Ainsi l'insertion d'ADN étranger va induire une abolition de l'alpha-complémentation. Les plasmides recombinants peuvent être repérés lorsqu'ils sont transformés dans la souche hôte par la couleur blanche des colonies, comparativement à la couleur bleu des colonies lorsque les bactéries sont transformées par le plasmide pUC18. Ce criblage s'effectue en présence d'IPTG et du substrat de l'enzyme le X-Gal.

1.3 Techniques de biologie moléculaire

1.3.1 Extraction de cosmides de *M.smegmatis* mc²

155

Les extractions de cosmides recombinants pYUB18:*M.tuberculosis* ont été effectuées selon la technique de lyse alcaline adaptée à *M.smegmatis* (Jacobs et al.1991, précédemment cité) avec quelques modifications. Les bactéries sont récupérées au cinquième jour de culture (fin de la phase exponentielle), centrifugées 10 mn à 5000 tours. Le culot de bactéries (3 ml) est resuspendu dans 5 ml de

solution A (50 mM glucose, 25 mM trisHCl pH 8, 10 mM EDTA, lysosyme 10 mg/ml) et incubé à 37°C pendant 20 mn. Deux volumes (10 ml) de solution B (0,2 N NaOH, 1% SDS) sont ensuite ajoutés et mélangés par inversion.

5 Le mélange est incubé 30 mn à 65°C, puis 15 mn à 4°C. Enfin 1,5 volume (7,5 ml) de solution C (5 M acétate de potassium, acide acétique 11,5%) est ajouté et mélangé par inversion. Le mélange est incubé 30 mn à 4°C. La préparation est ensuite centrifugée 15 mn à

10 13000 tours à 4°C, le surnageant récupéré, mesuré et additionné à un même volume de phénol/chloroforme 50/50.

Après extraction le tube est centrifugé à 4000 tours pendant 10 mn. La phase aqueuse est transférée

15 dans un tube propre et additionnée d'un double volume d'éthanol conservé à -20°C. Après retournement, celui-ci est conservé au moins 1 heure à -20°C, puis centrifugé 30 mn à 12000 tours. le culot est enfin lavé avec un volume d'éthanol à 70% conservé à -20°C

20 et séché au Speed-Vac 5 mn. Le culot sec est repris dans 500µl d'eau stérile et conservé à -20°C.

1.3.2 Extraction et purification de plasmides de E.coli

Les extractions rapides des cosmides pYUB18 et

25 plasmides pUC18 recombinants ont été effectuées par la technique de lyse alcaline (Birnboim et al.; Nucleic Acids Res.1979, 7:1513).

Les cosmides et plasmides recombinants intéressants ont été purifiés après une étape de lyse

30 alcaline par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium (Maniatis et coll, Cold Spring Harbor , New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1982).

1.3.3. Techniques de transformation

35 Méthode chimique au chlorure de calcium.

Cette technique classique a été utilisée pour transformer E.coli XL1-Blue par des plasmides pUC18 recombinants. Les bactéries compétentes sont tout d'abord préparées: 20 ml de milieu 2YT sont ensemencés
5 avec une préculture d'une nuit au 1/100. Les bactéries sont mises en culture agitée pendant 2 heures à 37°C jusqu'à DO = 0,6, puis centrifugées 10 mn à 4000 tours à 4°C. Le culot est repris dans 8 ml de CaCl₂, 100 mM, gardé 15 mn sur glace fondante, puis centrifugé à
10 nouveau 10 mn à 4000 tours à 4°C. Le culot est enfin repris dans 1,6 ml de CaCl₂ 100 mM gardé sur glace fondante à 30 mn.

Les bactéries compétentes ainsi préparées sont utilisées fraîchement pour les transformations ou
15 peuvent être conservées quelques jours à 4°C. Au moment de la transformation 200 µl de bactéries compétentes sont mélangés à 2 µl d'ADN. Le mélange est conservé 45 mn sur glace fondante, puis est soumis à un choc thermique de 2 mn à 42°C. 800 µl de milieu 2YT
20 sont ajoutés, puis la préparation est incubée une heure à 37°C sous agitation, puis étalée sur boîtes ML-ampicilline à raison de 50 µl à 200 µl par boîte. Le lendemain les colonies sont comptées et
25 l'efficacité de transformation calculée.

- Méthode physique d'électroporation.

Cette technique est utilisée pour transformer E.coli par des vecteurs de grande taille: E.coli souche NM554 a été électroporée par des cosmides
30 pYUB18 recombinants de taille supérieure à 50 kb. Les bactéries compétentes ont été préparées fraîchement: 200 ml de milieu 2YT sont ensemencés par une dilution au 1/100 d'une préculture d'une nuit; les bactéries sont cultivées 3 heures à 37°C, puis centrifugées à
35 6000 tours pendant 10 mn. Le culot est repris dans 10 ml d'eau stérile à 4°C, puis dans 190 ml d'eau stérile

à 4°C. Les bactéries sont centrifugées à nouveau à 6000 tours 10 mn et relavées dans 10 ml d'eau stérile à 4°C. Enfin le culot est repris dans 400 µl de glycérol à 10 %.

5 L'électroporation a été effectuée sur un appareil Bio-Rad Gene Pulser. 100 µl de bactéries sont mélangés à 1 à 4 µl d'ADN dans une cuve de 0,4 mm. Le mélange est soumis au choc électrique (2500 volts, 25 µF). Puis rapidement 1 ml de milieu 2 YT est ajouté
10 dans la cuve. L'ensemble est transféré dans un tube et incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Après incubation, la culture est étalée sur boîtes ML-ampicilline, à raison de 50µl à 200 µl par boîte. Le lendemain, les colonies sont comptées et l'efficacité
15 de transformation calculée.

1.3.4 Clonage de fragments de digestion enzymatique

L'ADN à cloner a été digéré par une endonucléase de restriction BamHI. De la même manière
20 le plasmide pUC18 a été digéré. Les fragments issus d'un cosmide pYUB18 recombinant d'intérêt ont été ligaturés dans le plasmide vecteur par l'activité de l'enzyme T4 DNA ligase (Amersham). La ligation a été effectuée dans un volume de 20µl à 16°C pendant une
25 nuit. Tout le mélange de ligation a été utilisé pour la transformation dans E.coli XL1-Blue. Après l'expression phénotypique toutes les bactéries sont étalées sur boîtes ML-ampicilline à 25 µg/ml, IPTG, X-Gal. Les clones recombinants ne permettant plus
30 l'alpha-complémentation ont été repérés par la couleur blanche des colonies.

Les clones recombinants ont été étudiés après purification par clonage. L'ADN plasmidique a été extrait par lyse alcaline puis analysé sur gel
35 d'agarose à 0,8 % avant ou après digestion par

l'endonucléase de restriction BamH I.

1.3.5 Construction d'une carte de restriction

Les plasmides recombinants pLA34 et pLA4, contenant un insert de 3 kb BamH I-BamH I cloné dans les deux orientations, ont été digérés par les différentes endonucléases de restriction présentant un site dans le lieu multisite (polylinker) de pUC18. Des digestions simples et doubles à l'aide des endonucléases de restriction, BamH I, Hind III, Sph I, Xba I, Sal I, Kpn I, EcoR I, Sma I ont été effectuées puis analysées en gel d'agarose à 0,8 %. Après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium la taille des différents fragments est déterminée en fonction de leur distance de migration par rapport à des marqueurs (un témoin interne de laboratoire, le plasmide pKN digéré par Pvu II).

1.4. Méthodes de détection des protéines.

1.4.1. Technique ELISA

Un test ELISA en compétition a été utilisé pour mesurer la concentration des protéines 45/47 kDa présentes dans différentes préparations issues de cultures bactériennes, à l'aide d'un sérum polyclonal (Romain et al., 1993, précédemment cités).

Ce sérum polyclonal de lapin a été obtenu contre les protéines 45/47 kDa par une technique classique d'immunisation: injection de 50 µg de protéines purifiées en adjuvant de Freund incomplet et de 25 µg un mois plus tard.

Les puits d'une première microplaque sont recouverts soit par les protéines purifiées en solution à la concentration de 1 µg/ml en tampon carbonate soit par un surnageant de Mycobacterium bovis BCG de 15 jours à la concentration de 10 µg/ml. La fixation des antigènes est effectuée pendant une heure à 37°C, puis la microplaque est lavée 5 fois au

PBS. Dans une seconde incubation les puits sont saturés par une solution de PBS gélatine 0,5 %, butanol 4%, pendant une heure à 37°C. La microplaque est ensuite lavée 5 fois au PBS-Tween 0,1 %.

5 Le test est effectué de la manière suivante:

Incubation dans une seconde microplaque de 50 µl du surnageant à analyser à des dilutions différentes (pur, 1/2, 1/4, 1/8, etc....) dans du PBS-Tween 0,1 % , gélatine 0,25%, butanol 4%, et de 50µl
10 du sérum de lapin préparé à la dilution 1/4000 dans du PBS-tween 0,1 %, gélatine 0,25 %, butanol 4%, une heure à 37°C, puis transfert sur la première microplaque du mélange et incubation une heure à 37°C. La microplaque est ensuite lavée 10 fois au PBS-tween
15 0,1 %. Enfin, un anticorps conjugué anti IgG H + L anti-lapin (BioSys) marqué à la phosphatase alcaline, préparé à la dilution du 1/4000 dans du PBS-tween 0,1 %, gélatine 0,25%, butanol 4%, a été incubé une heure à 37°C. La microplaque est lavée 10 fois au PBS-tween
20 0,1%.

Le substrat de l'enzyme, le para-nitro-phényl-phosphate (pNPP) est enfin incubé à la concentration de 40 mg/24ml en tampon NaHCO₃, MgCl₂ pH 9,6 pendant une heure ou une nuit. Les DO sont lues à 414 nm et
25 690 nm par le lecteur Titerteck Twinreader.

1.4.2. Technique d'immuno-empreinte

La technique classique d'électrophorèse en gel dénaturant SDS-PAGE a été utilisée (Laemmli, Nature 1970, 277:680-685), suivie d'un électrotransfert sur
30 membrane de PVDF (Towbin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76:4350-4354, Pluskal et al. Biotechniques 1986, 4: 272-283).

Les échantillons analysés sur gel sont quantitativement mesurés: en µg de lyophilisat pour
35 les surnageants de M.smegmatis (5 µg sont déposés), en

μg de protéines pour les lysats de E.coli (25 μg sont déposés).

5 Les protéines purifiées de M.bovis BCG sont déposées sur gel à raison de 0,25 μg de protéines par piste.

Les protéines transférées sur membrane sont révélées par le sérum polyclonal de lapin à une dilution au 1/500^e pour les protéines exprimées dans les mycobactéries.

10 Pour révéler les protéines recombinantes dans E.coli, ces anticorps polyclonaux ont été purifiés sur une colonne DEAE (Trisacryl^D), puis les immunoglobulines obtenues absorbées sur un lysat de E.coli immobilisé sur colonne Sépharose-4B activé par
15 le bromure de cyanogène (Pharmacia) (Maniatis et coll, 1982). Les anticorps non retenus sont conservés en pool à 4°C et utilisés pour révéler les protéines transférées sur membrane à une dilution au 1/100^e.

20 Un conjugué anti-Ig H + L (Bio-Sys), spécifique d'espèce, marqué par la phosphatase alcaline, est utilisé pour révéler les anticorps précédents à une dilution au 1/3000. Enfin l'activité phosphatase alcaline est révélée par deux substrats artificiels chromogènes: le bleu de tétrazolium et le 5-bromo 4
25 chloro 3-indolyl phosphate.

1.5. Séquençage de l'ADN:

Le séquençage nucléotidique a été effectué par l'utilisation d'un ensemble de clones obtenus par différentes délétions à partir des deux clones pLA34
30 et pLA4. Les délétions ont été choisies en fonction de la carte de restriction établie.

Le séquençage a été effectué à partir des matrices d'ADN plasmidique double-brin. La technique de Sanger a été appliquée par l'utilisation du kit T7
35 Sequencing (Pharmacia) et du ³⁵S ATP.

La séquence a été obtenue à l'aide de différents clones délétés et des amorces universelles (Direct and Reverse Primers) du plasmide pUC18, puis d'oligonucléotides synthétiques.

5 Les séquences ont été établies sur les deux brins complémentaires.

Les zones de compression dues au pourcentage élevé en GC de l'ADN génomique de *M.tuberculosis* (65%) ont été séquencées à l'aide du kit T7 Deaza G/A Sequencing (Pharmacia) contenant un analogue chimique du dGTP, le 7-Deaza dGTP.

1.6. Analyse des séquences:

15 Les comparaisons et assemblages des séquences contiguës obtenues ont été effectués à l'aide du programme STADEN sur Unix. Les homologues de séquences recherchées parmi les séquences des banques de données EMBL et Gen-Bank ont été faites en utilisant les programmes FASTA et T-FASTA de GCG.

2) Résultats

20 2.1 Clonage et expression des protéines de 45/47 kDa de *M.tuberculosis* dans *M.smegmatis*.

2.1.1. Criblage d'une banque génomique d'expression de *M.tuberculosis* dans *M.smegmatis*.

25 La banque génomique utilisée (Jacobs et al., 1991 précédemment cités) a été construite par clonage de fragments de 40 kb issus d'une digestion génomique partielle par l'endonucléase de restriction Sau 3a dans le vecteur cosmétique pYUB18. La taille du génome, estimée par électrophorèse en champs pulsé à 30 4200 kb est donc contenue dans environ 100 à 150 clones.

Un test ELISA en compétition permettant de doser les protéines en milieu liquide a été utilisé (Romain et al., 1993, précédemment cités). Il permet 35 de détecter et de définir une quantité de protéines de

45/47 kDa dans les surnageants de culture de M.bovis BCG de 7 jours (figure 8).

Ce test présente des avantages: une bonne sensibilité, c'est-à-dire la capacité de détecter une quantité de l'ordre de 1 ng/ml de protéines en milieu liquide à l'aide d'un sérum polyclonal dilué au 1/8000^e (Romain et al. 1993, précédemment cités) et une facilité de mise en oeuvre pour cribler une série d'échantillons rapidement.

Une série de 400 clones recombinants PYUB18::M.tuberculosis H37Rv, électroporés dans M. smegmatis, a été criblée.

Pour cela, les différents clones ont été cultivés pendant 7 jours en milieu 7H9 + OADC. Les protéines recombinantes sont recherchées dans ce test en analysant les surnageants obtenus après centrifugation des cultures.

Trois clones ont été trouvés capables d'exprimer des protéines reconnues par les anticorps polyclonaux spécifiques des protéines de 45/47 kDa de M.bovis BCG (figure 8). Lors de ce premier criblage les puits des plaques de microtitration étaient recouverts par un surnageant de culture de M.bovis BCG dans lequel les protéines de 45/47 kDa ont été évaluées à 2% de la masse totale. Les trois clones sélectionnés ont été confirmés dans une seconde expérience dans laquelle les puits des plaques de microtitration étaient recouverts par les protéines de 45/47 kDa purifiées.

2.1.2 Analyse génétique des cosmides recombinants sélectionnés.

Dans le but d'étudier les différents cosmides sélectionnés, ceux-ci ont été électroporés dans E.coli NM554 après extraction de l'ADN de M.smegmatis par lyse alcaline modifiée. L'obtention de l'ADN

extrachromosomique de mycobactéries est en effet un point difficile dû à la complexité de la paroi difficile à lyser d'une part et au faible nombre de copies des vecteurs qui a été déterminé de 3 à 10 en moyenne par bactérie. Les trois clones transformés dans E.coli NM554 ont été isolés sur boîtes ML-kanamycine, l'ADN cosmétique, extrait par lyse alcaline a été analysé en gel d'agarose à 0,8%.

Les trois clones présentent un ADN de taille supérieure à 50 kb. Une digestion par l'endonuclease de restriction BamH I a été effectuée pour distinguer les profils de ces trois cosmides sélectionnés. Ceux-ci se sont révélés identiques (figure 9). Les profils montrent une bande de 12 kb correspondant au vecteur pYUB18, puis une série de bandes de plus bas poids moléculaire correspondant au fragment de l'ADN cloné (environ 40 kb). Compte-tenu du nombre de bandes obtenues et de leur localisation en gel, on peut estimer que les cosmides isolés étaient identiques.

Différentes digestions du seul cosmide pLA1, par les endonucléases de restriction présentant des sites de coupures plus ou moins fréquents pour un ADN riche en G + C ont été effectuées dans le but de distinguer des fragments de longueurs moyennes et suffisantes pour contenir le ou les gènes de structure des protéines de 45/47 kDa et d'effectuer un sous-clonage de ceux-ci (figure 10).

2.1.3. Expression des protéines de 45/47 kDa de M.tuberculosis dans M.smegmatis.

Le cosmide pLA1, contenant un insert d'environ 40 kb, permet l'expression de protéines recombinantes dans M.smegmatis, détectées dans un surnageant de culture par des anticorps polyclonaux.

Afin de déterminer la taille approximative des protéines exprimées, un surnageant de culture de 7

jours lyophilisé a été analysé en immuno-empreinte. Les protéines recombinantes exprimées dans *M.smegmatis* présentent deux poids moléculaires de 45/47 kDa apparents identiques à celles exprimées dans *M.bovis* BCG (figure 11).

Dans une autre expérience, le niveau d'expression de ces protéines recombinantes dans *M.smegmatis* a été comparé à celui dans *M.bovis* BCG. Une quantité déterminée de protéines de surnageants lyophilisés est utilisée lors d'un dosage en test ELISA en compétition. Différentes concentrations des surnageants lyophilisés sont mises en présence d'une dilution au 1/80000^e du sérum polyclonal de lapin. *M.smegmatis* recombinant permet l'expression de protéines en quantité environ 5 fois plus importante que *M.bovis* BCG (figure 12).

Un sous-clonage de cet insert ainsi que l'analyse des protéines recombinantes dans un hôte hétérologue (*E.coli*) ont été effectués afin de déterminer le nombre de gènes codant pour ces protéines.

2.2. Clonage et expression des protéines de 45/47 kDa de *M.tuberculosis* dans *E.coli*.

2.2.1. Sous-clonage et expression des protéines de 45/47 kDa dans *E.coli*.

Lorsque pLA1 a été transformé dans un hôte hétérologue *E.coli* NM554, aucune protéine recombinante n'a été détectée dans les surnageants de culture ou lysats bactériens. Dans le but de favoriser l'expression de ces protéines, un sous-clonage des fragments issus d'une digestion BamH I du cosmide a été effectué dans le plasmide pUC18 (Yanisch-Perron et al. Gene, 1985, 33:103,119).

Les plasmides recombinants pUC18::*M.tuberculosis* transformés dans *E.coli* XL1-Blue

ont été sélectionnés par défaut d'expression de la bêta-galactosidase de la bactérie hôte. L'ADN plasmidique de chaque clone "blanc" d'une série de 36 clones) a été préparé par lyse alcaline et digéré par
5 l'endonucléase de restriction BamH I.

La taille des plasmides obtenus observée en gel d'agarose montre plusieurs profils indiquant que les plasmides recombinants sont différents (figure 13A).

La taille des inserts clonés également observée
10 en gel d'agarose montre des profils de restriction différents (figure 13B). Ces profils présentent tous un fragment de 2,8 kb correspondant au vecteur pUC18 et une série de fragments de tailles différentes correspondant aux inserts clonés.

15 Tous les fragments de la digestion ont été clonés seuls, par deux ou par trois excepté le fragment de 12 kb qui par sa grande taille est difficilement clonable.

Les 36 clones sélectionnés ont été criblés sur
20 leur capacité à induire une expression de protéines recombinantes dans E.coli XL1-Blue. Cette expérience a été effectuée dans le même test ELISA en compétition que précédemment.

Aucune protéine recombinante n'a été détectée
25 dans les surnageants de culture bactérienne. Par contre, des protéines recombinantes ont été détectées dans les lysats bactériens de clones contenant tous au moins un insert de 3 kb.

Le niveau d'expression des protéines mesuré
30 dans ce test apparaît influencé par la taille des plasmides. Parmi les 36 clones étudiés, 2 clones permettant une expression, le pLA34 et le pLA35, contenant respectivement des inserts de 3kb et 7 kb ont été trouvés. Celle-ci est plus importante pour le
35 pLA34 comme le montrent les résultats du tableau 1

(ci-après).

2.2.2. Carte de restriction des clones pLA34 et pLA34-2.

5 Une carte de restriction du plasmide pLA34 a été établie, situant différents sites de coupure d'endonucléases de restriction courantes, présents dans le lieu multisite (polylinker) de pUC18 (figure 14). Un site unique de restriction EcoR I sépare l'insert de 3 kb en deux fragments de 2 kb et 1 kb.

10 Un clone, le pLA34-2 présentant un insert de 2 kb BamH I-EcoR I a été construit à partir du précédent par délétion. Celui-ci permet également l'expression de protéines recombinantes détectées dans des lysats bactériens (figure 15).

15 L'analyse des lysats bactériens en immun Empreinte montre des protéines de deux poids moléculaires de 45 et 47 kDa, apparemment identiques aux protéines natives exprimées dans M.bovis BCG (figure 16).

20 2.2.3. Analyse de la séquence nucléotidique codant pour les protéines de 45/47 kDa de M.tuberculosis H37Rv:

La séquence nucléotidique complète du gène qui code pour les protéines de 45/47 kDa, la séquence en
25 amont et la séquence déduite en acides aminés sont présentées sur la séquence SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2. L'unique gène permettant l'expression du doublet de protéines présente 975 paires de bases entre la position 1082 et la position 2056 inclus de la
30 séquence nucléotidique.

Une séquence consensus de fixation au ribosome (Shine Dalgarno) a été repérée en amont du gène.

Le gène présente un haut pourcentage en GC de 69,4 % comparativement au GC de 65% pour
35 M.tuberculosis.

La protéine déduite du gène présente une séquence signal typique avec un site de clivage ANA de la signal peptidase.

5 Le gène code pour une protéine de 325 amino-acides qui comporte une séquence signal de 39 amino-acides.

10 Les résultats obtenus par analyse biochimique de la composition en acides aminés des protéines purifiées de M.bovis BCG et de M.tuberculosis comparés à ceux déduits de la séquence protéique sont en bon accord (tableau 2). Ceci permet de conclure sur l'existence d'un seul gène qui permet l'expression de protéines de deux poids moléculaires dans Mycobacterium smegmatis et E.coli.

15 2.2.4. Analyse de la séquence protéique et comparaison de séquences:

Le poids moléculaire calculé à partir de la séquence déduite en acides aminés est de 28,7 kDa.

20 Le point isoélectrique calculé est de 4,36. Ce dernier résultat se trouve également en bon accord avec une détermination biochimique du point isoélectrique effectuée sur les protéines purifiées de M.bovis BCG.

25 La séquence déduite en acides aminés montre un pourcentage en proline et alanine important (21,8% et 19,1%).

30 La séquence entière montre une homologie avec une protéine récemment décrite de Mycobacterium leprae. Les deux séquences sont comparées sur la figure 17. Le score d'homologie entre les deux protéines est de 65,4%. Cette protéine décrite chez Mycobacterium leprae présente également une séquence signal typique des protéines sécrétées.

35 Le profil d'hydrophobicité de la protéine déduite de M.tuberculosis, objet de la présente

invention (SEQ ID N° 2) a été établi. Il est représenté sur la figure 18.

TABLEAU 1: Clonage dans pUC18 d'un insert de 3 kb
permettant l'expression de protéines recombinantes
dans E.coli

5

10

Clones pUC18: M.tuberculosis	Taille des inserts	Expression des protéines ELISA
N° 34	3 kb	+ +
N° 35	3 kb + 4 kb	+
N° 4	3 kb	-
n° 17	3 kb + 4 kb + 1,7 kb	-

TABLEAU 2

Composition en acides aminés des protéines de M.tuberculosis et M.bovis BCG de 45/47 kDa et de M.leprae de 27/32 kDa					
Séquence déduite			Analyse chimique*		
10	Résidu	(% en moles)		(% en moles)	
		<u>M.leprae</u>	<u>M.tuber</u>	<u>M.tuber</u>	<u>M.bovis</u>
					BCG
	A = Ala	13.3	18.5	19.2	19.2
	B = Asx	-	-	10.4	10.6
15	C = Cys	0.4	0	< 0.5	< 0.5
	D = Asp	4.8	5.2	-	-
	E = Glu	4.8	3.1	-	-
	F = Phe	2.0	2.5	2.4	2.2
	G = Gly	8.0	7.0	7.1	7.4
20	H = His	0.8	0.3	0.4	0.4
	I = Ile	5.2	2.5	2.2	2.3
	K = Lys	2.8	2.5	2.7	2.9
	L = Leu	6.8	4.2	4.4	4.7
	M = Met	0.8	0.7	0.5	0.5
25	N = Asn	4.0	4.5	-	-
	P = Pro	13.3	21.7	20.9	21.9
	Q = Gln	3.2	2.8	-	-
	R = Arg	2.8	2.8	2.7	2.5
	S = Ser	9.6	5.9	5.6	5.0
30	T = Thr	4.8	6.3	5.7	5.4
	V = Val	8.0	5.9	6.2	5.8
	W = Trp	1.2	1.4	N.D.	N.D.
	Y = Tyr	2.8	2.1	2.2	2.2
	Z = Glx	-	-	6.3	6.0
35	* Asx = Asp + Asn Glx = Glu + Gln				

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(1) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT PASTEUR
- (B) RUE: 28, rue du Docteur Roux
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75724
- (G) TELEPHONE: 4 568 8000
- (H) TELECOPIE: 43 06 98 35
- (I) TELEX: 250609 F

(11) TITRE DE L' INVENTION: PROTEINES DE MYCOBACTERIES, MICROORGANISMES
LES PRODUISANT ET LEURS UTILISATIONS VACCINALES ET POUR LA
DETECTION DE LA TUBERCULOSE

(111) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(1v) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2061 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(11) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(111) HYPOTHETIQUE: NON

(1v) ANTI-SENS: NON

(1x) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1082..2057

(x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GTGCTCGGGC CCAACGGTGC GGGCAAGTCC ACCGCCCTGC ATGTTATCGC GGGGCTGCTT	60
CGCCCCCGAC GCGGGCTTGG TACGTTTGGG GGACCGGGTG TTGACCGACA CCGAGGCCGG	120
GGTGAATGTG GCGACCCACG ACCGTCGAGT CGGGCTGCTG TTGCAAGACC CGTTGTTGTT	180
TCCACACCTG AGCGTGGCCA AAAACGTGGC CTTCGGACCA CAATGCCGTC GCGGGATGTT	240
TGGGTCCGGG CGCGCGCTAG GACAAGGGCG TCGGCACTGC GATGGCTGCG CGAGGTGAAC	300
GCCGAGCAGT TCGCCGACCG TAAGCCTCGT CAGCTATCCG GGGGCCAAGC CCAGCGCGTC	360
GCCATCGCGC GAGCGTTGGC GGCCGAACCG GATGTGTTGC TGCTCGACGA GCCGCTGACC	420
GGACTCGATG TGGCCGCGGC CGCGGGTATC CGTTCGGTGT TGCCTAGTGT CGTCGCGAGG	480
AGCGGTTGCG CGGTAGTCCT GACGACCCAT GACCTGCTGG ACGTGTTAC GCTGGCCGAC	540
CGGGTATTGG TGCTCGAGTC CGGCACGATC GCCGAGATCG GCCCGGTTGC CGATGTGCTT	600
ACCGCACCTC GCAGTCGTTT CGGAGCCCGT ATCGCCGGAG TCAACCTGGT CAATGGGACC	660
ATTGGTCCGG ACGGCTCGCT GCGCACCCAG TCCGGCGCCC ACTGGTACGG CACCCCGGTC	720
CAGGATTTGC CTACTGGGCA TGAGGCAATC GCGGTGTTCC CGCCGACGGC GGTGGCGGTG	780
TATCCGGAAC CGCCGCACGG AAGCCCGCGC AATATCGTCG GGCTGACGGT GGCGGAGGTG	840
GATACCCGCG GACCCACGGT CCTGGTGCGC GGGCATGATC AGCCTGGTGG CGCGCCTGGC	900
CTTGCCGCAT GCATCACCGT CGATGCCGCC ACCGAACTGC GTGTGGCGCC CGGATCGCGC	960
GTGTGGTTCA GCGTCAAGGC GCAGGAAGTG GCCCTGCACC CGGCACCCCA CCAACACGCC	1020
AGTTCATGAG CCGACCCGCG CCGTCCTTGC GTCGCGCCGT TAACACGGTA GGTTCTTCGC	1080
C ATG CAT CAG GTG GAC CCC AAC TTG ACA CGT CGC AAG GGA CGA TTG	1126
Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly Arg Leu	
1 5 10 15	
GCG GCA CTG GCT ATC GCG GCG ATG GCC AGC GCC AGC CTG GTG ACC GTT	1174
Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala Ser Leu Val Thr Val	
20 25 30	
GCG GTG CCC GCG ACC GCC AAC GCC GAT CCG GAG CCA GCG CCC CCG GTA	1222
Ala Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val	
35 40 45	
CCC ACA ACG GCC GCC TCG CCG CCG TCG ACC GCT GCA GCG CCA CCC GCA	1270
Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala	
50 55 60	

45

CCG Pro 65	GCG Ala	ACA Thr	CCT Pro	GTT Val	GCC Ala	CCC Pro	CCA Pro	CCA Pro	CCG Pro	GCC Ala	GCC Ala	GCC Ala	AAC Asn	ACG Thr	CCG Pro	1318
AAT Asn 80	GCC Ala	CAG Gln	CCG Pro	GGC Gly	GAT Asp	CCC Pro	AAC Asn	GCA Ala	GCA Ala	CCT Pro	CCG Pro	CCG Pro	GCC Ala	GAC Asp	CCG Pro	1366
AAC Asn	GCA Ala	CCG Pro	CCG Pro	CCA Pro	CCT Pro	GTC Val	ATT Ile	GCC Ala	CCA Pro	AAC Asn	GCA Ala	CCC Pro	CAA Gln	CCT Pro	GTC Val	1414
CGG Arg	ATC Ile	GAC Asp	AAC Asn	CCG Pro	GTT Val	GGA Gly	GGA Gly	TTC Phe	AGC Ser	TTC Phe	GCG Ala	CTG Leu	CCT Pro	GCT Ala	GGC Gly	1462
TGG Trp	GTG Val	GAG Glu	TCT Ser	GAC Asp	GCC Ala	GCC Ala	CAC His	TTC Phe	GAC Asp	TAC Tyr	GGT Gly	TCA Ser	GCA Ala	CTC Leu	CTC Leu	1510
AGC Ser	AAA Lys	ACC Thr	ACC Thr	GGG Gly	GAC Asp	CCG Pro	CCA Pro	TTT Phe	CCC Pro	GGA Gly	CAG Gln	CCG Pro	CCG Pro	CCG Pro	GTG Val	1558
GCC Ala 160	AAT Asn	GAC Asp	ACC Thr	CGT Arg	ATC Ile	GTG Val	CTC Leu	GGC Gly	CGG Arg	CTA Leu	GAC Asp	CAA Gln	AAG Lys	CTT Leu	TAC Tyr	1606
GCC Ala	AGC Ser	GCC Ala	GAA Glu	GCC Ala	ACC Thr	GAC Asp	TCC Ser	AAG Lys	GCC Ala	GCG Ala	GCC Ala	CGG Arg	TTG Leu	GGC Gly	TCG Ser	1654
GAC Asp	ATG Met	GGT Gly	GAG Glu	TTC Phe	TAT Tyr	ATG Met	CCC Pro	TAC Tyr	CCG Pro	GGC Gly	ACC Thr	CGG Arg	ATC Ile	AAC Asn	CAG Gln	1702
GAA Glu	ACC Thr	GTC Val	TCG Ser	CTC Leu	GAC Asp	GCC Ala	AAC Asn	GGG Gly	GTG Val	TCT Ser	GGA Gly	AGC Ser	GCG Ala	TCG Ser	TAT Tyr	1750
TAC Tyr	GAA Glu	GTC Val	AAG Lys	TTC Phe	AGC Ser	GAT Asp	CCG Pro	AGT Ser	AAG Lys	CCG Pro	AAC Asn	GGC Gly	CAG Gln	ATC Ile	TGG Trp	1798
ACG Thr 240	GGC Gly	GTA Val	ATC Ile	GGC Gly	TCG Ser	CCC Pro	GCG Ala	GCG Ala	AAC Asn	GCA Ala	CCG Pro	GAC Asp	GCC Ala	GGG Gly	CCC Pro	1846
CCT Pro	CAG Gln	CGC Arg	TGG Trp	TTT Phe	GTG Val	GTA Val	TGG Trp	CTC Leu	GGG Gly	ACC Thr	GCC Ala	AAC Asn	AAC Asn	CCG Pro	GTG Val	1894
GAC Asp	AAG Lys	GGC Gly	GCG Ala	GCC Ala	AAG Lys	GCG Ala	CTG Leu	GCC Ala	GAA Glu	TCG Ser	ATC Ile	CGG Arg	CCT Pro	TTG Leu	GTC Val	1942

GCC CCG CCG CCG GCG CCG GCA CCG GCT CCT GCA GAG CCC GCT CCG GCG Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro Ala 290 295 300	1990
CCG GCG CCG GCC GGG GAA GTC GCT CCT ACC CCG ACG ACA CCG ACA CCG Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro 305 310 315	2038
CAG CGG ACC TTA CCG GCC T GACC Gln Arg Thr Leu Pro Ala 320 325	2061

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 325 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala Ser Leu Val Thr Val Ala
20 25 30

Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro
35 40 45

Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro
50 55 60

Ala Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr Pro Asn
65 70 75 80

Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro Pro Ala Asp Pro Asn
85 90 95

Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg
100 105 110

Ile Asp Asn Pro Val Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp
115 120 125

Val Glu Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu Ser
130 135 140

Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro Pro Pro Val Ala
145 150 155 160

Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala
 165 170 175
 Ser Ala Glu Ala Thr Asp Ser Lys Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp
 180 185 190
 Met Gly Glu Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu
 195 200 205
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr
 210 215 220
 Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro Asn Gly Gln Ile Trp Thr
 225 230 235 240
 Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro
 245 250 255
 Gln Arg Trp Phe Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp
 260 265 270
 Lys Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu Val Ala
 275 280 285
 Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro Ala Pro
 290 295 300
 Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln
 305 310 315 320
 Arg Thr Leu Pro Ala
 325

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 286 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Pro Pro
 1 5 10 15
 Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala Thr Pro Val Ala Pro Pro
 20 25 30

Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn
 35 40 45
 Ala Ala Pro Pro Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile
 50 55 60
 Ala Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val Gly Gly
 65 70 75 80
 Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu Ser Asp Ala Ala His
 85 90 95
 Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro
 100 105 110
 Phe Pro Gly Gln Pro Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu
 115 120 125
 Gly Arg Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp Ser
 130 135 140
 Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu Phe Tyr Met Pro
 145 150 155 160
 Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn
 165 170 175
 Gly Val Ser Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro
 180 185 190
 Ser Lys Pro Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala
 195 200 205
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe Val Val Trp
 210 215 220
 Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys Gly Ala Ala Lys Ala Leu
 225 230 235 240
 Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro
 245 250 255
 Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala
 260 265 270
 Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala
 275 280 285

REVENDEICATIONS

1. Protéine présentant au moins une partie de la séquence SEQ ID N°3 suivante :

5 Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala
 Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala
 Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr
 Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro
 Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala
 Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val
 10 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu
 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro
 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp
 15 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu
 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala
 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala
 20 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys
 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro
 25 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

2. Protéine selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle présente au moins une partie de la séquence SEQ ID N° 2 suivante:

30 Met His Gln Val Asp Pro Asn Leu Thr Arg Arg Lys Gly
 Arg Leu Ala Ala Leu Ala Ile Ala Ala Met Ala Ser Ala
 Ser Leu Val Thr Val Ala Val Pro Ala Thr Ala Asn Ala
 Asp Pro Glu Pro Ala Pro Pro Val Pro Thr Thr Ala Ala
 Ser Pro Pro Ser Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Ala
 Thr Pro Val Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Asn Thr
 35 Pro Asn Ala Gln Pro Gly Asp Pro Asn Ala Ala Pro Pro

Pro Ala Asp Pro Asn Ala Pro Pro Pro Pro Val Ile Ala
 Pro Asn Ala Pro Gln Pro Val Arg Ile Asp Asn Pro Val
 Gly Gly Phe Ser Phe Ala Leu Pro Ala Gly Trp Val Glu
 Ser Asp Ala Ala His Phe Asp Tyr Gly Ser Ala Leu Leu
 5 Ser Lys Thr Thr Gly Asp Pro Pro Phe Pro Gly Gln Pro
 Pro Pro Val Ala Asn Asp Thr Arg Ile Val Leu Gly Arg
 Leu Asp Gln Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Glu Ala Thr Asp
 Ser Lys Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Asp Met Gly Glu
 Phe Tyr Met Pro Tyr Pro Gly Thr Arg Ile Asn Gln Glu
 10 Thr Val Ser Leu Asp Ala Asn Gly Val Ser Gly Ser Ala
 Ser Tyr Tyr Glu Val Lys Phe Ser Asp Pro Ser Lys Pro
 Asn Gly Gln Ile Trp Thr Gly Val Ile Gly Ser Pro Ala
 Ala Asn Ala Pro Asp Ala Gly Pro Pro Gln Arg Trp Phe
 Val Val Trp Leu Gly Thr Ala Asn Asn Pro Val Asp Lys
 15 Gly Ala Ala Lys Ala Leu Ala Glu Ser Ile Arg Pro Leu
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu
 Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro
 Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala

3. Protéine hybride comprenant au moins une
 20 partie d'une des séquences SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3
 selon l'une des revendications 1 et 2 et une séquence
 d'un peptide ou d'une protéine susceptible d'induire
 une réponse immunitaire.

4. Protéine selon la revendication 3,
 25 caractérisée en ce que la réponse immunitaire est une
 réponse humorale et/ou une réponse cellulaire.

5. Protéine selon l'une des revendications 3 et
 4 caractérisée en ce que le peptide ou la protéine est
 une partie, en particulier un épitope, de la toxine
 30 diphtérique, de la toxine tétanique, de l'antigène HBS
 du virus HBV, ou de l'antigène VP1 du virus de la
 poliomyélite ou autre toxine ou antigène viral.

6. Oligonucléotide codant pour une protéine
 selon l'une des revendications 1 à 5.

35 7. ADN selon la revendication 6 caractérisé en

ce qu'il présente au moins une partie de la séquence
SEQ ID N°1 suivante:

```
5  GT GCTCGGGCCC AACGGTGCGG GCAAGTCCAC CGCCCTGCAT
    GTTATCGCGG GGCTGCTTCG CCCCCGACGC GGGCTTGCGTA CGTTTGGGGG
    ACCGGGTGTT GACCGACACC GAGGCCGGGG TGAATGTGGC GACCCACGAC
    CGTCGAGTCG GGCTGCTGTT GCAAGACCCG TTGTTGTTTC CACACCTGAG
    CGTGGCCAAA AACGTGGCCT TCGGACCACA ATGCCGTCGC GGGATGTTTG
10  GGTCCGGGCG CGCGCTAGGA CAAGGGCGTC GGCCTGCGA TGGCTGCGCG
    AGGTGAACGC CGAGCAGTTC GCCGACCCTA AGCCTCGTCA GCTATCCGGG
    GGCCAAGCCC AGCGCGTCGC CATCGCGCGA GCGTTGGCGG CCGAACCGBA
    TGTGTTGCTG CTCGACGAGC CGCTGACCGG ACTCGATGTG GCCGCGGCCG
    CGGGTATCCG TTCGGTGTTG CGTAGTGTG TCGCGAGGAG CGGTGCGCG
15  GTAGTCCTGA CGACCCATGA CCTGCTGGAC GTGTTACGC TGGCCGACCG
    GGTATTGGTG CTCGAGTCCG GCACGATCGC CGAGATCGGC CCGGTTGCCG
    ATGTGCTTAC CGCACCTCGC AGTCGTTTCG GAGCCCGTAT CGCCGGAGTC
    AACCTGGTCA ATGGGACCAT TGGTCCGGAC GGCTCGCTGC GCACCCAGTC
    CGGCGCCCAC TGGTACGGCA CCCCAGTCCA GGATTGCTCT ACTGGGCATG
20  AGGCAATCGC GGTGTTCCCG CCGACGGCGG TGGCGGTGTA TCCGGAACCG
    CCGCACGGAA GCCCGCGCAA TATCGTCGGG CTGACGGTGG CGGAGGTGGA
    TACCCGCGGA CCCACGGTCC TGGTGCGCGG GCATGATCAG CCTGGTGGCG
    CGCCTGGCCT TGCCGCATGC ATCACCCTCG ATGCCGCCAC CGAACTGCGT
    GTGGCGCCCG GATCGCGCGT GTGGTTCAGC GTCAAGGCGC AGGAAGTGGC
25  CCTGCACCCG GCACCCACAC AACACGCCAG TTCATGAGCC GACCCGCGCC
    GTCCTTGCGT CGCGCCGTTA ACACGGTAGG TTCTTCGCCA TGCATCAGGT
    GGACCCCAAC TTGACACGTC GCAAGGGACG ATTGGCGGCA CTGGCTATCG
    CGGCGATGGC CAGCGCCAGC CTGGTGACCG TTGCGGTGCC CGCGACCGCC
    AACGCCGATC CGGAGCCAGC GCCCCCGGTA CCCACAACGG CCGCCTCGCC
30  GCCGTGACCG GCTGCAGCGC CACCCGCACC GGCGACACCT GTTGCCCCCC
    CACCACCGGC CGCCGCCAAC ACGCCGAATG CCCAGCCGGG CGATCCCAAC
    GCAGCACCTC CGCCGGCCGA CCCGAACGCA CCGCCGCCAC CTGTCAATTG
    CCCAAACGCA CCCCAACCTG TCCGGATCGA CAACCCGGTT GGAGGATTCA
    GCTTCGCGCT GCCTGCTGGC TGGGTGGAGT CTGACGCCGC CCACTTCGAC
35  TACGGTTCAG CACTCCTCAG CAAAACCACC GGGGACCCGC CATTTCCCGG
    ACAGCCGCCG CCGGTGGCCA ATGACACCCG TATCGTGCTC GGCCGGCTAG
```

ACCAAAAGCT TTACGCCAGC GCCGAAGCCA CCGACTCCAA GGCCGCGGCC
CGGTTGGGCT CGGACATGGG TGAGTTCTAT ATGCCCTACC CGGGCACCCC
GATCAACCAG GAAACCGTCT CGCTCGACGC CAACGGGGTG TCTGGAAGCG
CGTCGTATTA CGAAGTCAAG TTCAGCGATC CGAGTAAGCC GAACGGCCAG
5 ATCTGGACGG GCGTAATCGG CTCGCCCCGCG GCGAACGCAC CGGACGCCGG
GCCCCCTCAG CGCTGGTTTG TGGTATGGCT CGGGACCGCC AACAACCCGG
TGGACAAGGG CGCGGCCAAG GCGCTGGCCG AATCGATCCG GCCTTTGGTC
GCCCCGCCGC CGGCGCCGGC ACCGGCTCCT GCAGAGCCCG CTCCGGCGCC
GGCGCCGGCC GGGGAAGTCG CTCCTACCCC GACGACACCG ACACCGCAGC
10 GGACCTTACC GGCCTGACC

8. Microorganisme produisant une protéine selon l'une des revendications 1 à 5.

15 9. Microorganisme selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite protéine est présente au moins en partie à sa surface.

10. Microorganisme selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est une bactérie.

20 11. Microorganisme selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il est une mycobactérie, en particulier M.bovis BCG.

25 12. Composition pharmaceutique comprenant une quantité efficace d'une protéine ou d'un microorganisme selon l'une des revendications 1 à 5 et 8 à 11 en association avec des diluants ou des excipients pharmaceutiquement compatibles.

30 13. Médicament ou vaccin comprenant une protéine ou un microorganisme selon l'une des revendications 1 à 5 et 8 à 11.

35 14. Procédé de détection d'anticorps spécifiques de la tuberculose dans lequel un fluide biologique, susceptible de contenir lesdits anticorps, est mis en contact avec une protéine selon l'une des revendications 1 à 5.

15. Procédé selon la revendication 14,

caractérisé en ce que lesdites protéines sont fixées sur un support.

5 16. Trousse de détection pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 14 et 15 comprenant au moins une préparation de protéine selon l'une des revendications 1 à 5 et des solutions tamponnées pour la mise en oeuvre du procédé.

10 17. Trousse selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle comprend un réactif mettant en évidence le complexe anticorps-protéine formé.

18. Anticorps réagissant spécifiquement avec une protéine selon l'une des revendications 1 à 5.

1/15

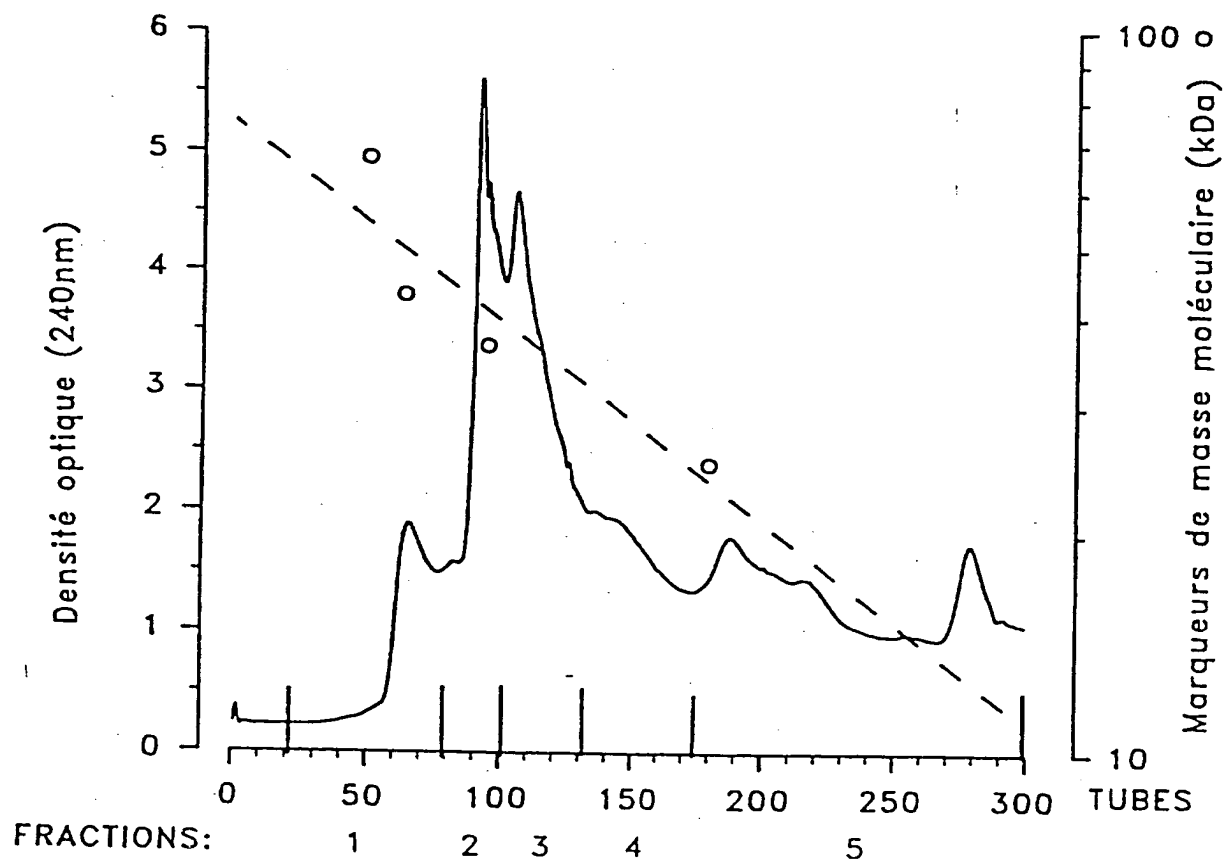


FIGURE 1

2/15

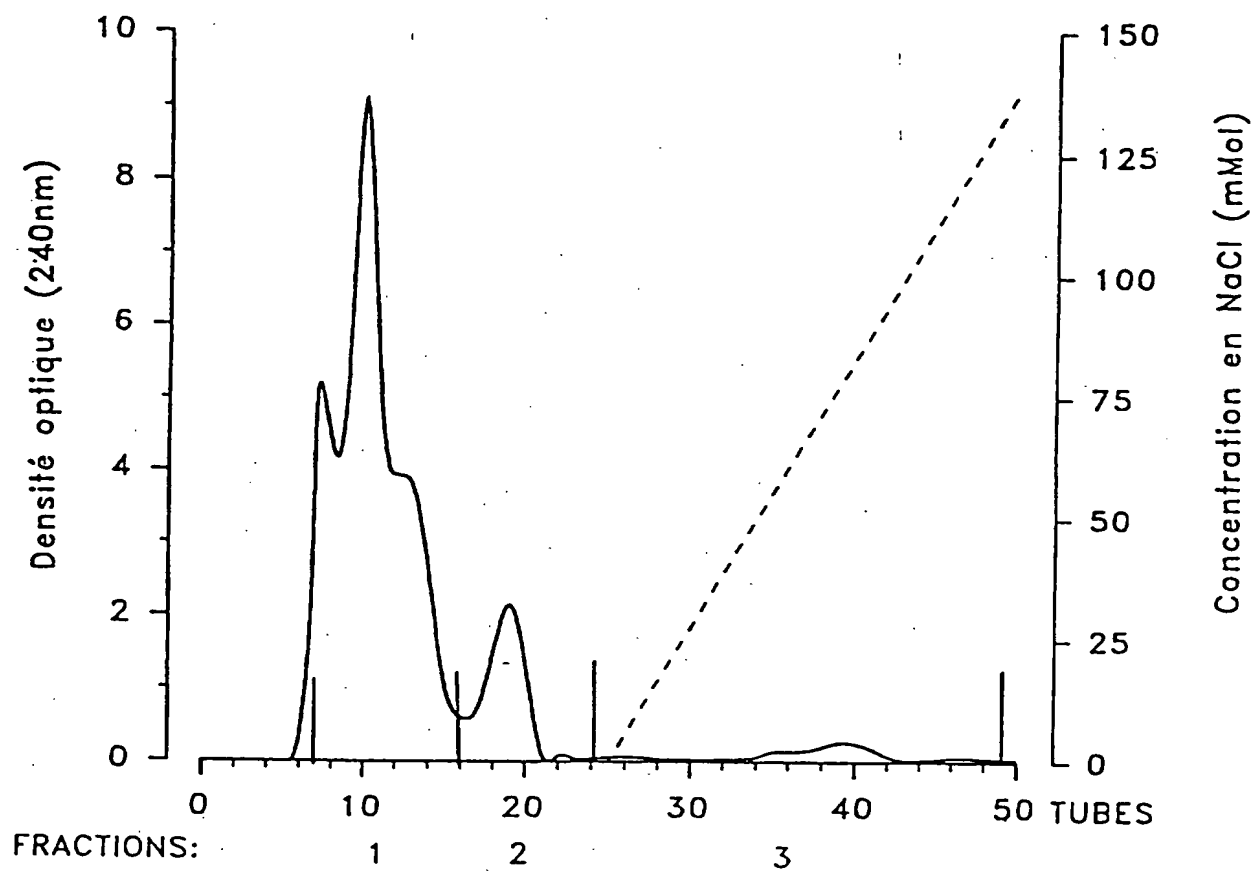


FIGURE 2

3/15

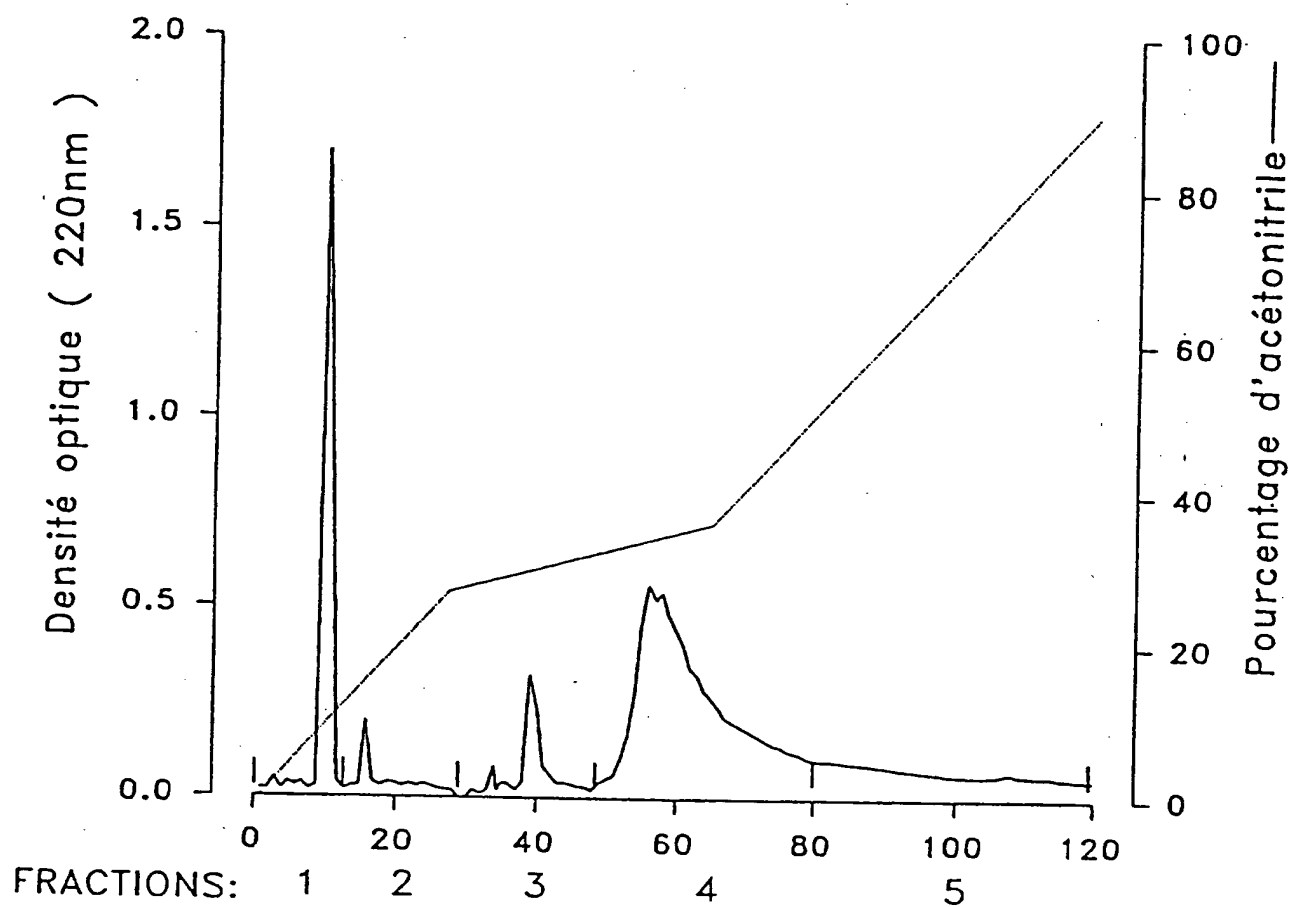


FIGURE 3

4/15

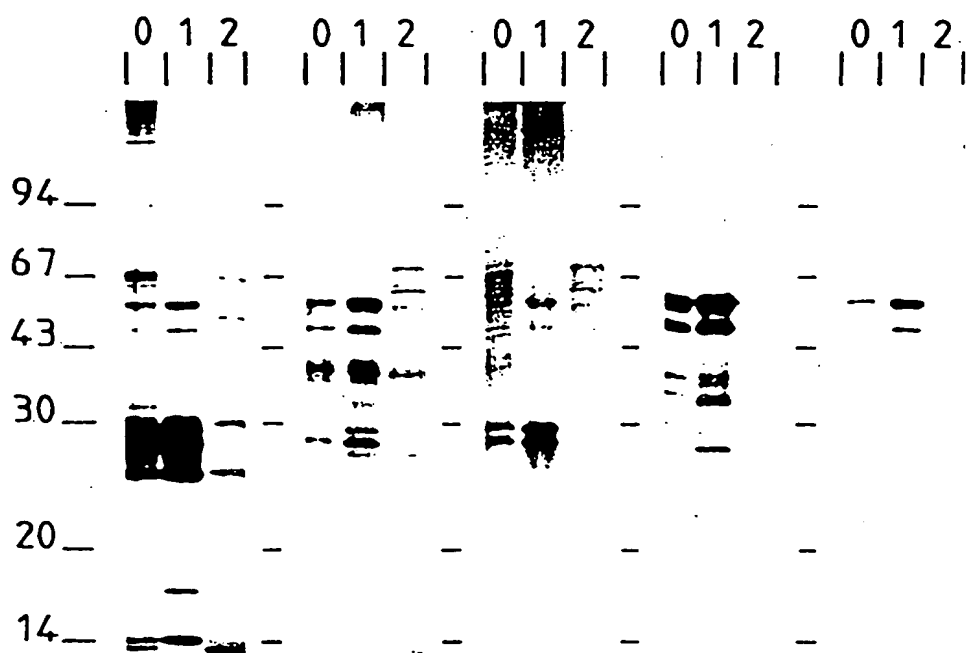
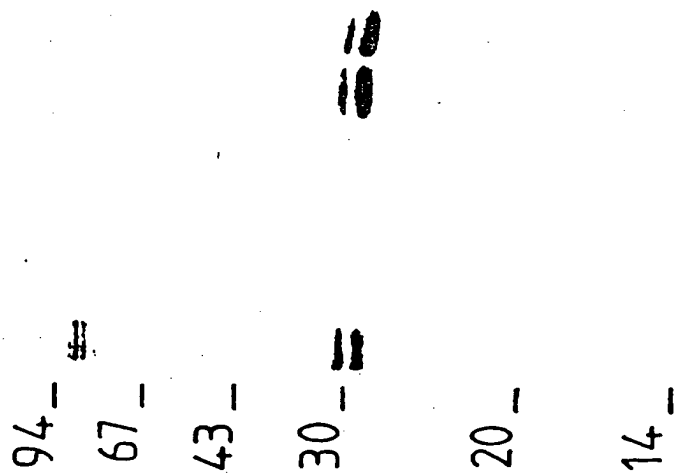


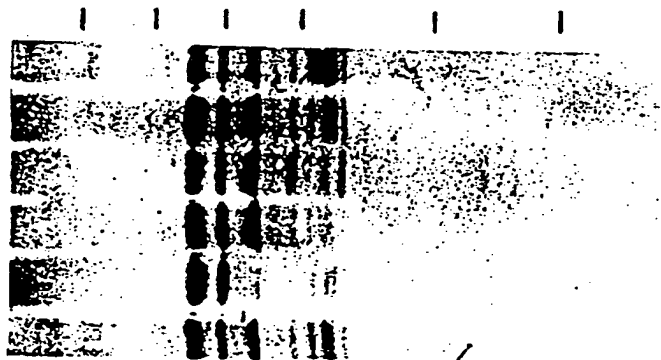
FIG. 4A FIG. 4B FIG. 4C FIG. 4D FIG. 4E

5/15

0 1 2 3 4 5



0 1 2 3 4 5



0 1 2 3 4 5

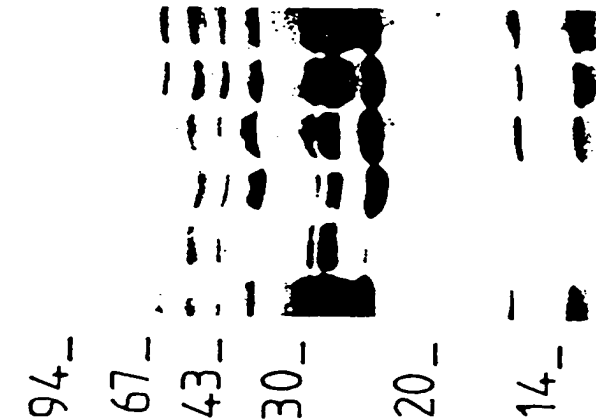


FIG. 5C

FIG. 5B

FIG. 5A

6/15

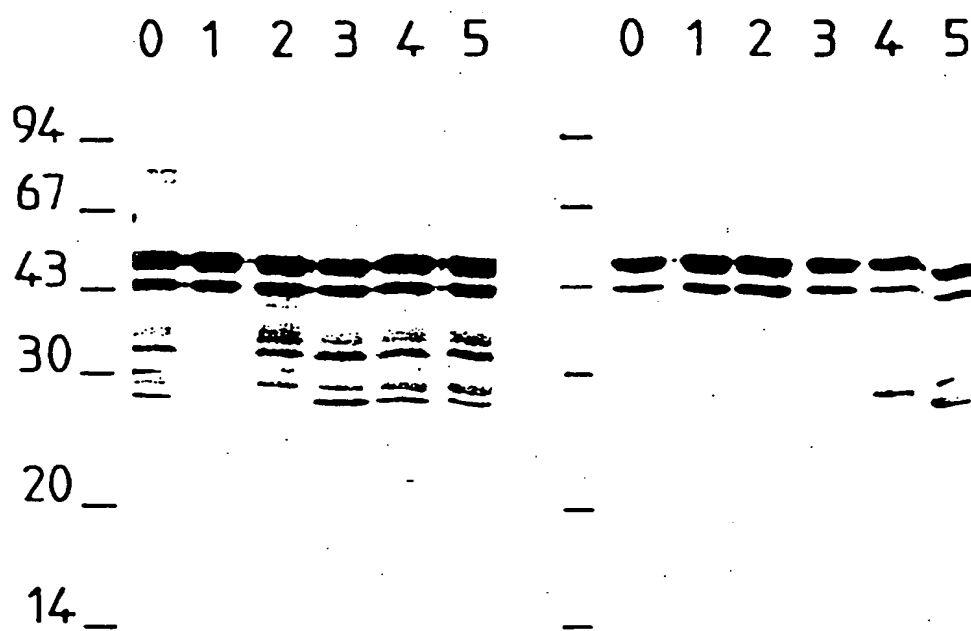


FIG. 5D

FIG. 5E

7/15

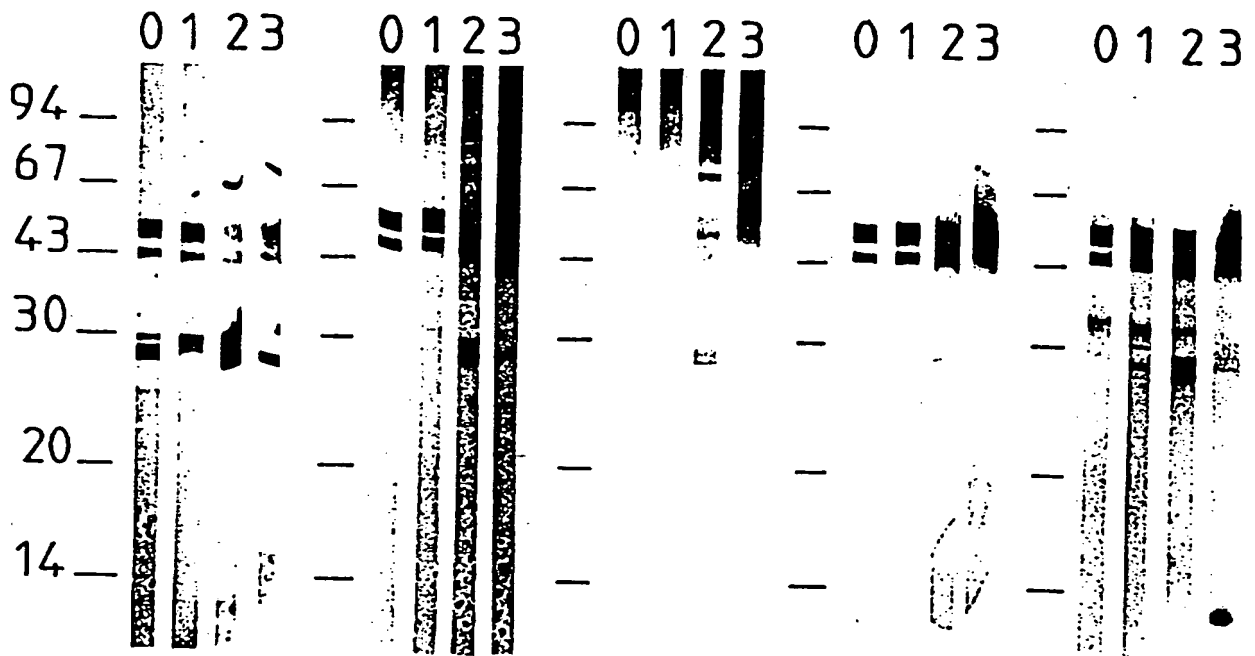


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

FIG. 6D

FIG. 6E

8/15

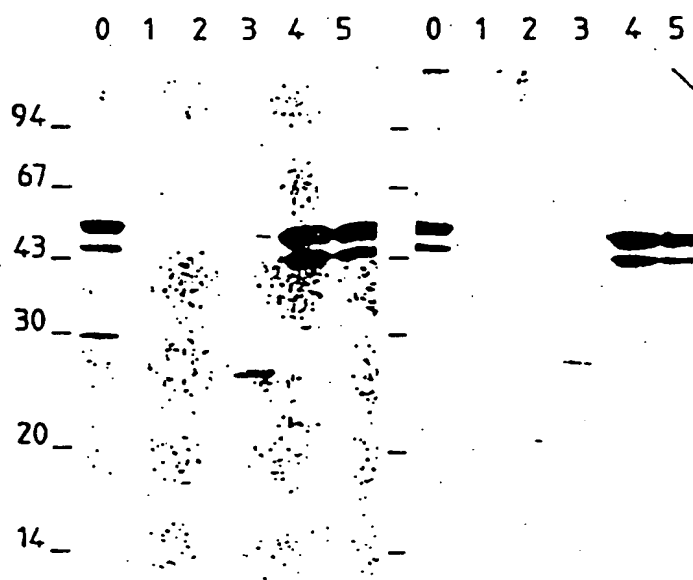


FIG. 7A

FIG. 7B



FIG. 7C

FIG. 7D

SEQ ID2

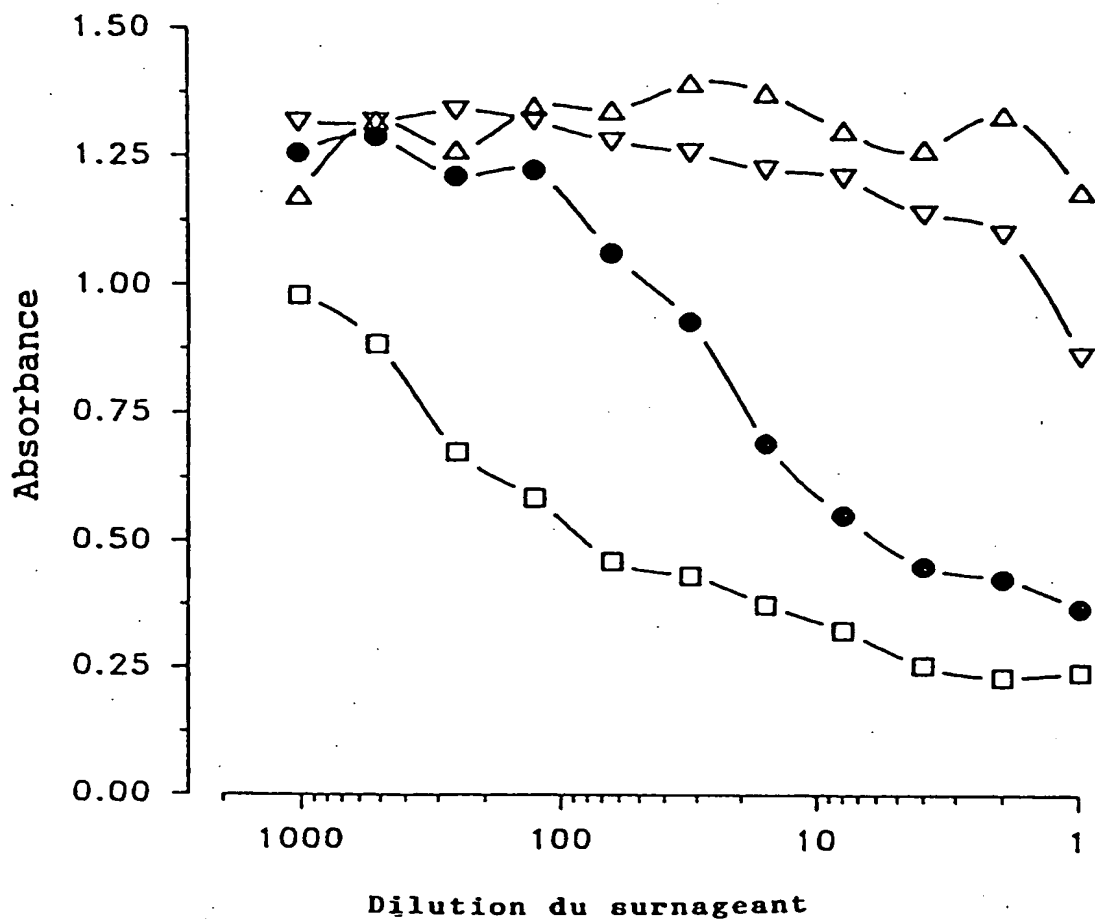
```

      280      290      300      310      320
SEQ ID2 KALAESIRPLVAPPPAPAPAPAEPAPAPAPAGEVAPTPTTPTPORTLPAX
      1:111111: :11 11::111 :1
mln431 KELAESIRSEMAPIPASVSAPAPVGXAIRHPLRCHCGPCFLDPPPAEQTTVDNRHSSVYT
      290      300      310      320      330      340

```

FIGURE 17

9/15



- - Surnageant de *M. bovis* BCG
- ▲ - Surnageant de *M. smegmatis* non transformé
- - Surnageant de *M. smegmatis* transformé par un clone recombinant capable d'exprimer des protéines recombinantes reconnues par les anticorps.
- ▼ - Surnageant de *M. smegmatis* transformé par un clone recombinant n'exprimant pas de protéines recombinantes reconnues par les anticorps.

FIGURE 8

10/15

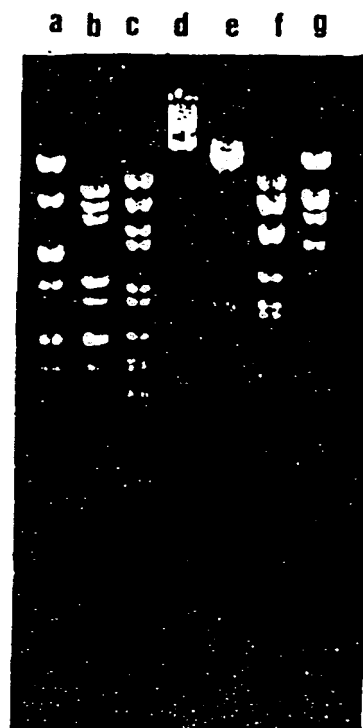
FIGURE 9

kb
6 —
2.9 —
2 —
1.65 —
1.3 —
0.75 —
0.5 —



FIGURE 10

kb
6 —
2.9 —
2 —
1.65 —
1.3 —



11/15

FIGURE 11

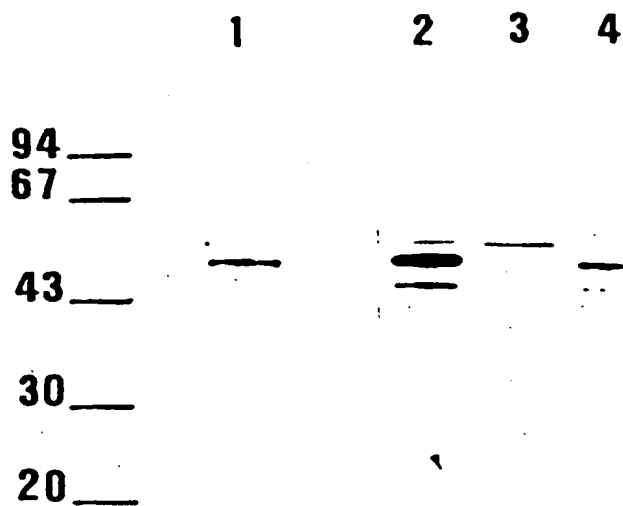
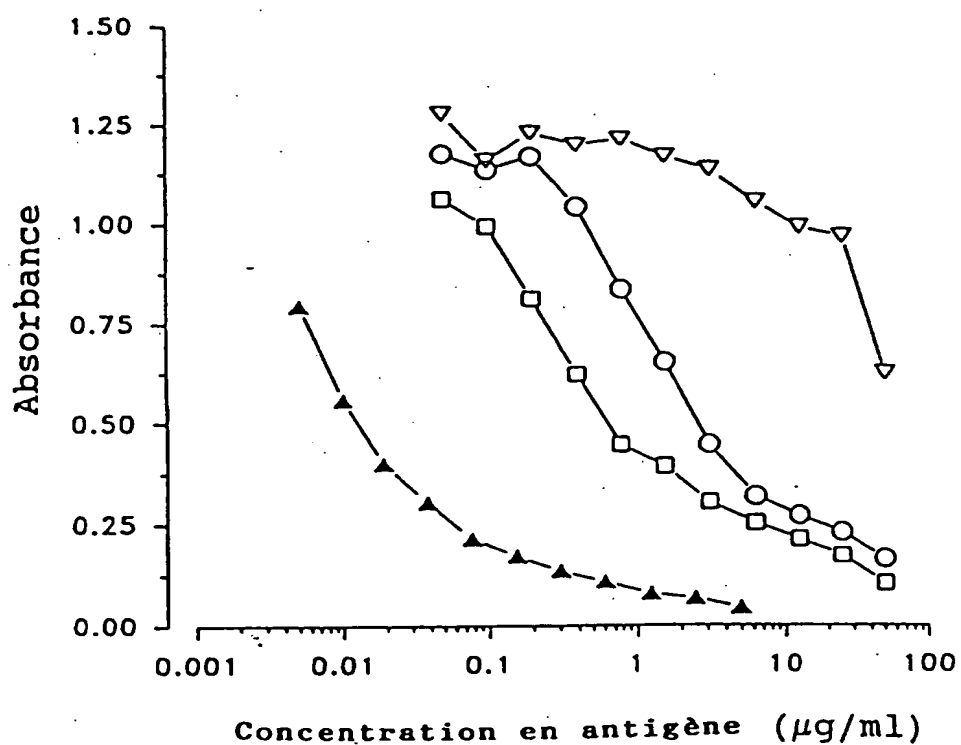


FIGURE 12



- ▲ - Protéines purifiées de 45/47 kDa
- - Surnageant de *M. smegmatis* mc²155 transformé par pLA1
- - Surnageant de *M. bovis* BCG
- ▽ - Surnageant de *M. smegmatis* mc²155 non transformé

12/15

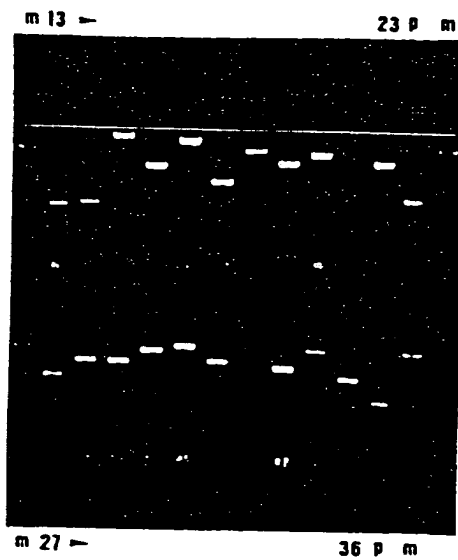


FIGURE 13A

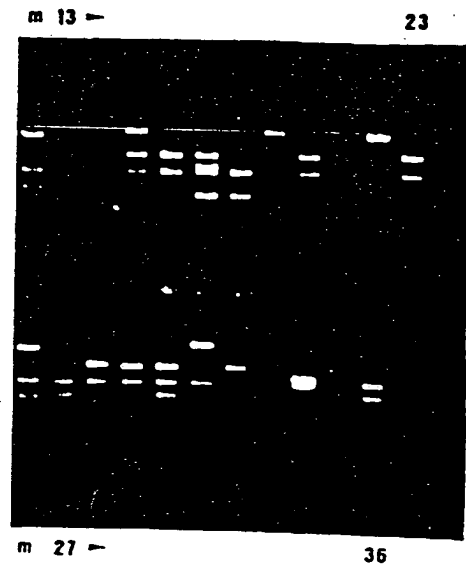


FIGURE 13B

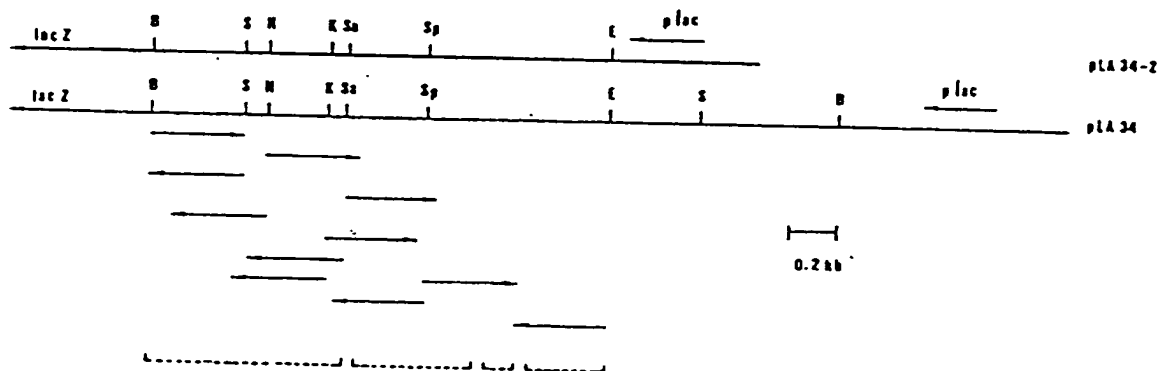


FIGURE 14

13/15

1 2 3 4

94 —

67 —

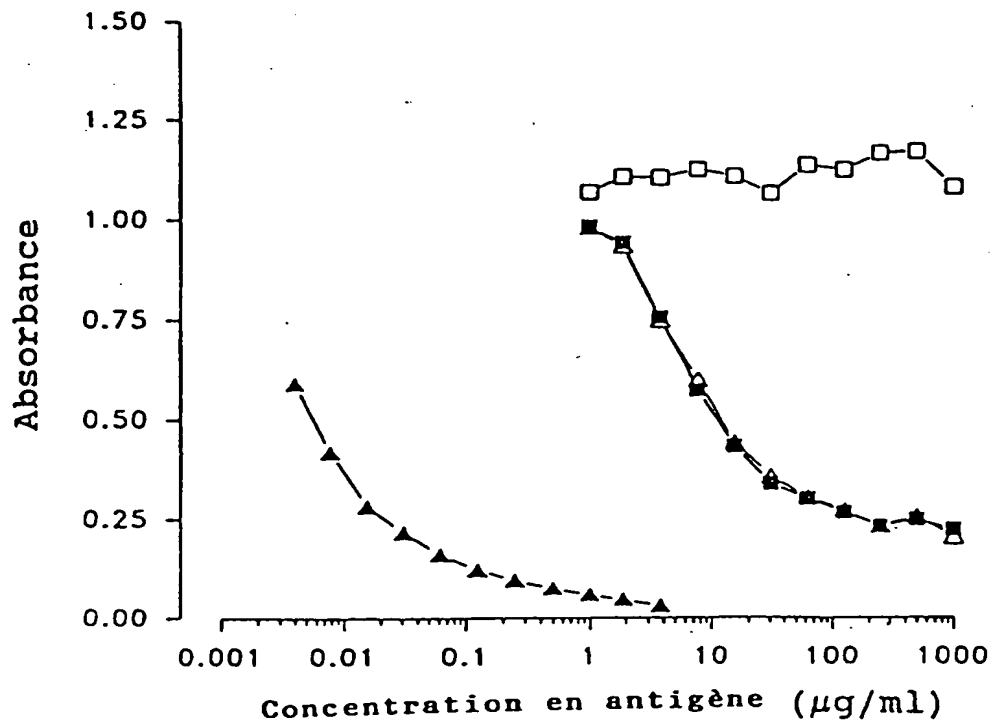
43 —

30 —

20 —

FIGURE 15

FIGURE 16



- ▲ Protéines purifiées de 45/47 kDa
- Lysat de E. coli XL1-Blue transformé par pLA34
- △ Lysat de E. coli XL1-Blue transformé par pLA34-2
- Lysat de E. coli XL1-Blue non transformé

15/15

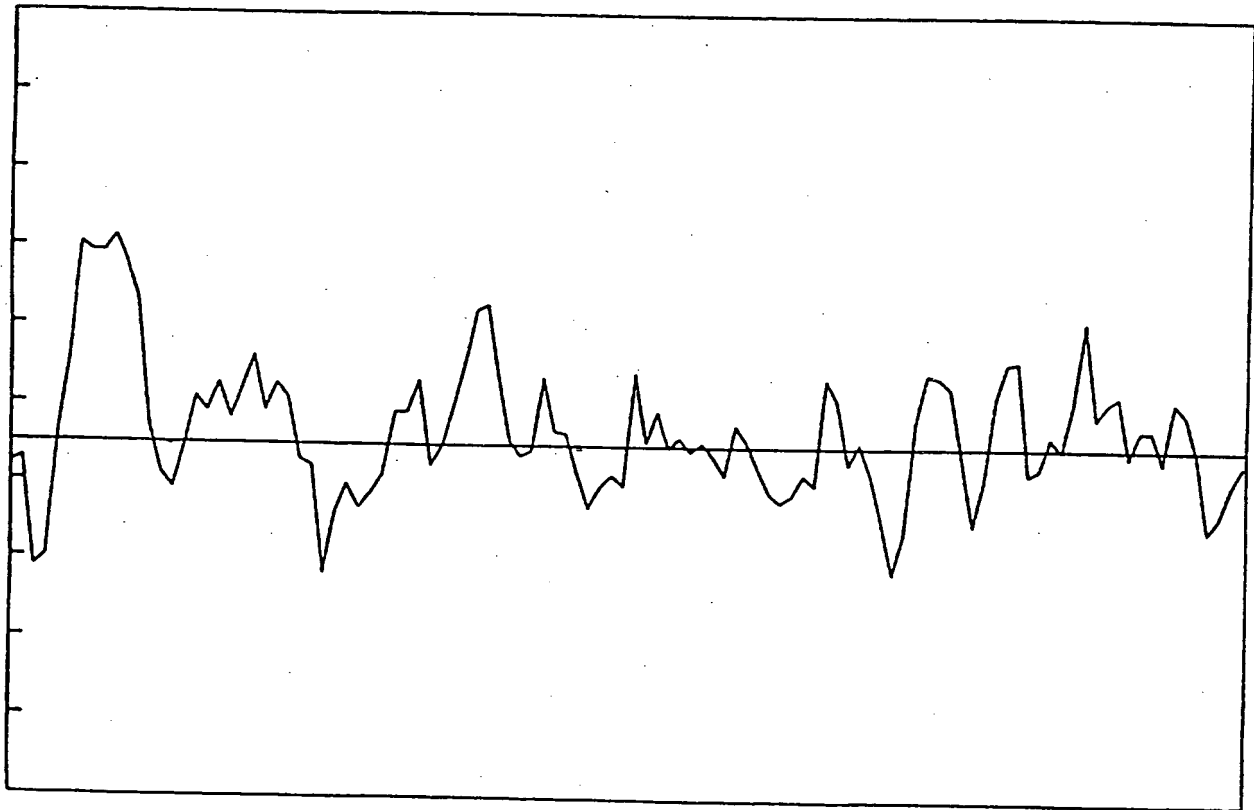


FIGURE 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/31 C07K14/35 G01N33/53 C12N15/62 C07K16/12
A61K39/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 10, October 1995, WASHINGTON US, pages 4003-4010, XP002001489 LAQUEYRERIE A. ET AL.: "Cloning, sequencing, and expression of the apa gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex" see the whole document --- -/--	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 1996

Date of mailing of the international search report

10.05.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 61, no. 2, February 1993, WASHINGTON US, pages 742-750, XP002001490 ROMAIN F. ET AL.: "Identification of a Mycobacterium bovis BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria" cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1,2, 8-10, 12-18</p>
Y	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 1, January 1994, WASHINGTON US, pages 252-258, XP002001491 WIELES B. ET AL. : "Characterization of a Mycobacterium leprae antigen related to the secreted Mycobacterium tuberculosis protein MPT32" cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	<p>1,2, 8-10, 12-18</p>
Y	<p>J. EXP. MED., vol. 180, July 1994, pages 319-327, XP000568830 CRISTINA M. ET AL.: "Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from Mycobacterium leprae" see figure 3</p> <p>-----</p>	<p>1,2, 8-10, 12-18</p>

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/31 C07K14/35
A61K39/04

G01N33/53

C12N15/62

C07K16/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K G01N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 10, Octobre 1995, WASHINGTON US, pages 4003-4010, XP002001489 LAQUEYRERIE A. ET AL.: "Cloning, sequencing, and expression of the apa gene coding for the Mycobacterium tuberculosis 45/47-kilodalton secreted antigen complex" voir le document en entier</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-18



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Avril 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10.05.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 61, no. 2, Février 1993, WASHINGTON US, pages 742-750, XP002001490 ROMAIN F. ET AL.: "Identification of a Mycobacterium bovis BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria" cité dans la demande voir le document en entier</p>	<p>1,2, 8-10, 12-18</p>
Y	<p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 1, Janvier 1994, WASHINGTON US, pages 252-258, XP002001491 WIELES B. ET AL. : "Characterization of a Mycobacterium leprae antigen related to the secreted Mycobacterium tuberculosis protein MPT32" cité dans la demande voir le document en entier</p>	<p>1,2, 8-10, 12-18</p>
Y	<p>J. EXP. MED., vol. 180, Juillet 1994, pages 319-327, XP000568830 CRISTINA M. ET AL.: "Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from Mycobacterium leprae" voir figure 3</p>	<p>1,2, 8-10, 12-18</p>